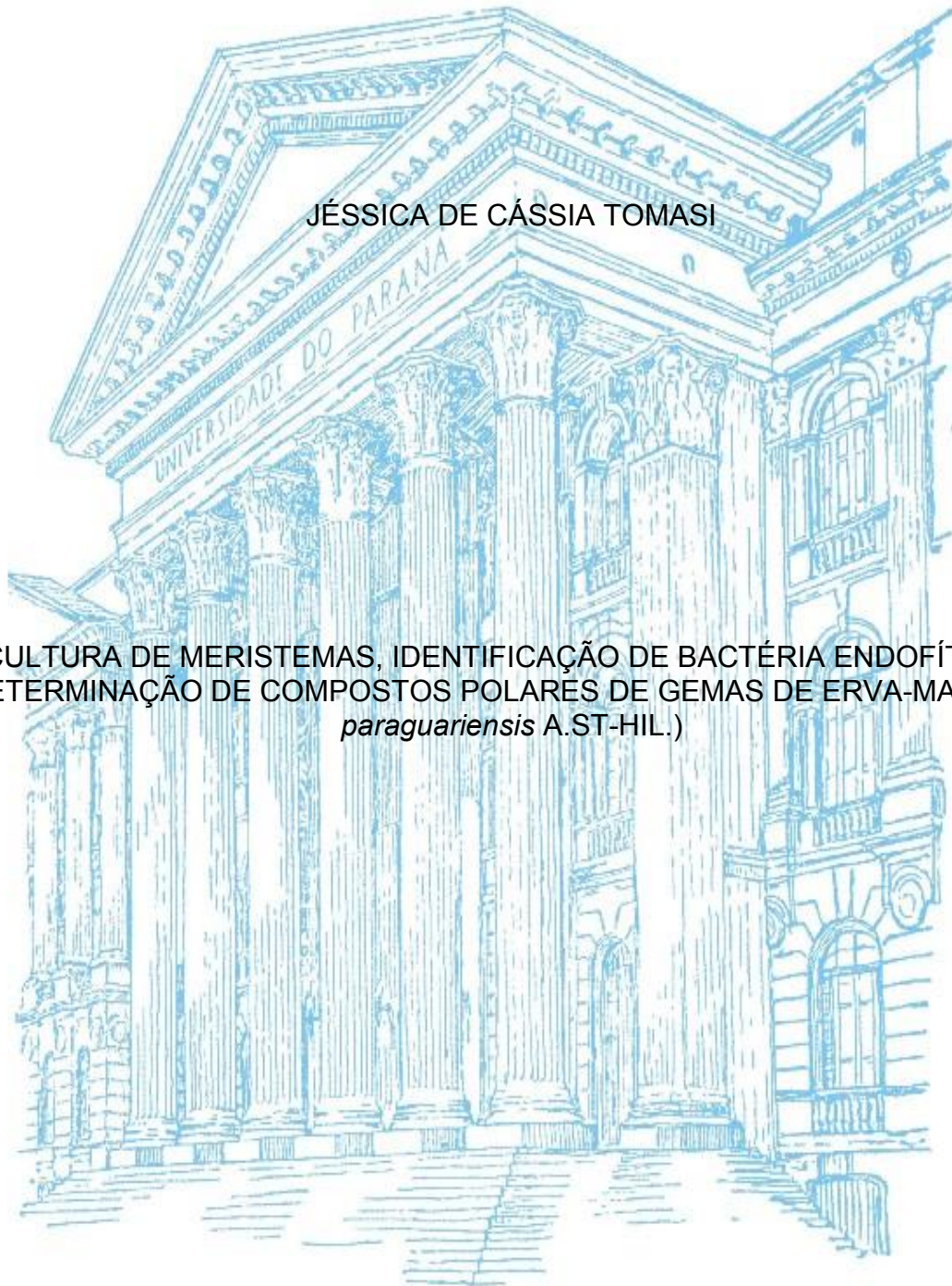


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JÉSSICA DE CÁSSIA TOMASI

CULTURA DE MERISTEMAS, IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIA ENDOFÍTICA E
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS POLARES DE GEMAS DE ERVA-MATE (*Ilex*
paraguariensis A.ST-HIL.)



CURITIBA
2016

JÉSSICA DE CÁSSIA TOMASI

CULTURA DE MERISTEMAS, IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIA ENDOFÍTICA E
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS POLARES DE GEMAS DE ERVA-MATE (*Ilex*
paraguariensis A.ST-HIL.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

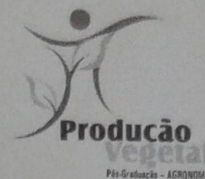
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marguerite G. G. Quoirin

Co-orientadora: Dr.^a Juliana Degenhardt-Goldbach

CURITIBA
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL

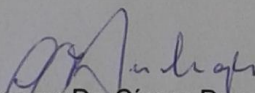


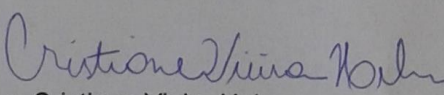
PARECER

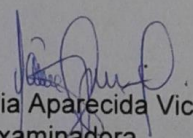
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **JESSICA DE CÁSSIA TOMASI**, sob o título "**CULTURA DE MERISTEMAS, IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIA ENDOFÍTICA E DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS POLARES DE GEMAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. ST-HIL.)**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

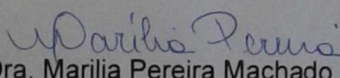
Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

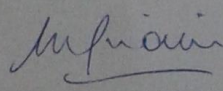
Curitiba, 03 de Março de 2016.


Professor Dr. Cícero Deschamps
Coordenador do Programa


Dra. Cristiane Vieira Helm
Primeira Examinadora


Professora Dra. Vânia Aparecida Vicente
Segunda Examinadora


Dra. Marília Pereira Machado
Terceira Examinadora


Professora Dra. Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin
Presidente da Banca e Orientadora

À minha família, que é a melhor parte de mim, pois sem eles eu nada seria. Minha mãe Márcia, meu pai Edson e meu irmão Willian, muito obrigada por todo apoio, amor e compreensão. Vocês são a razão das minhas conquistas.

Aos meus avós paternos e maternos, Carmen, Ludovi, Herica e Lucas, por entenderem a ausência em muitos momentos e mesmo assim ao meu lado seguir.

Aos meus tios e primos, Simone, Richard, Endrigo, Carmen e Rickson, por todo apoio, amizade, votos de confiança e amor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha família.

À Prof.^a Dr.^a Marguerite Quoirin, por me aceitar como sua orientanda e por todo aprendizado profissional e pessoal que me proporcionou.

À Dr.^a Juliana Degenhardt-Goldbach, pela orientação e apoio nos momentos de desânimo e principalmente por sua amizade e compreensão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade da realização deste trabalho.

À Embrapa Florestas, pela estrutura cedida para todo o desenvolvimento da minha pesquisa.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Às Ms.^a Germana D. Santos, Tamires O. Mello pela ajuda profissional, ensinamentos e amizade.

Ao Dr. Fabrício A. Hansel pela experiência profissional compartilhada e toda sua paciência.

As minhas queridas amigas, que hoje considero como parte de minha família, Renata, Cassiana, Thais, Laudiane, Gisela, Janaína e Gheniffer por permanecerem firmes ao meu lado, e principalmente pela amizade sincera.

Aos companheiros de estudo do grupo GEBV, pelos conhecimentos compartilhados e amizade.

Às minhas irmãs de alma Juliana, Letícia, Fernanda, Jaqueline, Micheli e Jesica por mesmo longe estarem presentes durante todos os anos do mestrado.

À Luciana que compartilhou comigo o dia-a-dia durante todo o mestrado.

Aos meus amigos da minha cidade natal Palmeira das Missões-RS, por sempre me acolherem de volta nas poucas vezes que me fiz presente.

Aos demais colegas de pós-graduação que fizeram parte desta caminhada.

Meus sinceros agradecimentos.

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

Coríntios 13:2

CULTURA DE MERISTEMAS, IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIA ENDOFÍTICA E DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS POLARES DE GEMAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A.ST-HIL)

RESUMO GERAL

A erva-mate é uma planta nativa do Brasil de grande importância econômica para a região sul do país. Suas folhas servem de matéria prima para produção de bebidas como chá mate, tererê e chimarrão, entre outros produtos. A propagação sexuada da espécie apresenta problemas decorrentes da dormência embrionária das sementes e baixo poder germinativo. A propagação vegetativa, via estaquia também enfrenta dificuldades de enraizamento de material adulto, sendo necessário rejuvenescimento para obtenção de bons resultados com esta técnica. Assim, a micropropagação é uma alternativa para obtenção de um grande número de plantas, a partir de material vegetal selecionado por programas de melhoramento genético. O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento *in vitro* de meristemas de erva-mate, assim como, identificação de bactéria endofítica isolada destes explantes e determinação de metabólitos polares de gemas no momento da coleta, utilizando material vegetal de clones elite denominados F1, F2, A03 e A07. Primeiro foram estudados o efeito do meio de cultura (MS, 1/2MS, 1/4MS e WPM), clone (F1, F2, A03, A07), concentrações do antioxidante carvão ativado (1, 2 e 3 g.L⁻¹), de citocininas (cinetina, BAP e 2iP) e do agente desinfestante (hipoclorito de sódio e cloreto de mercúrio) no estabelecimento *in vitro* de meristemas. Como resultados, aponta-se ser os clones F1 e F2 os mais responsivos em cultura de meristemas, o meio de cultura WPM adicionado de 8,8 µM de 2iP, 0,2 µM de ANA e 3g.L⁻¹ de carvão ativado o mais indicado para o estabelecimento *in vitro* do clone F1. Não foi observado efeito fitotóxico significativo dos agentes desinfestantes testados. Em seguida isolou-se uma bactéria endofítica do meristema que foi identificada como sendo *Agrobacterium larrymoorei*. Numa segunda etapa, foram estudados os metabólitos extraídos de gemas de erva-mate. Para tal, foram utilizadas gemas recém-coletadas e, após extração dos compostos e derivatização, as amostras foram analisadas utilizando cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa. As análises apontaram presença de ácidos fenólicos como ácido caféico e ácido clorogênico, além de monossacarídeos como glicose, frutose e ribose; açúcares álcoois como manitol e inositol e dissacarídeos como maltose e sacarose. Em conclusão, foi possível o estabelecimento de meristemas de erva mate *in vitro* e a bactéria endofítica *A. larrymoorei* isolada do meristema foi identificada pela primeira vez em erva-mate. Além disso, há diferenças entre os compostos presentes nas gemas dos genótipos avaliados foi formulada uma hipótese para explicar essas diferenças: os clones podem estar estressados no sistema semi-hidropônico. O clone F1, caso seja introduzido *in vitro*, seria o genótipo com maior dificuldade de estabelecimento devido à maior concentração de ácidos caféico e clorogênico nas gemas.

Palavras-chave: *Agrobacterium larrymoorei*, carvão ativado, 2iP, compostos fenólicos.

SHOOT MERISTEM CULTURE, IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA
AND DETERMINATION OF POLAR METABOLITES IN BUDS OF YERBA MATE
(*Ilex paraguariensis* A. ST-HIL)

ABSTRACT

Yerba mate is native to Brazil and has a great economic importance in the south of the country. Its leaves serve as raw material for the production of beverages such as mate tea, mate and terere, among other products. The sexual propagation of the species faces problems arising from embryonic seed dormancy and low germination. Vegetative propagation via cuttings also faces difficulties of rooting of adult material, requiring rejuvenation to obtain good results. Thus, the micropropagation is an alternative for obtaining a large number of plants from material selected by breeding programs. The objective of this study was the *in vitro* establishment of yerba mate shoot meristems, as well as the identification of an endophytic bacteria isolated from these explants and determination of polar metabolites in buds at the time of collection, using plant material from elite clones called F1, F2, A03 and A07. First we studied the effect of culture medium (MS, ½ MS, ¼ MS and WPM), clone (F1, F2, A0, A07), concentrations of activated charcoal (01, 2, 3 g.L⁻¹), cytokinins (kinetin, BAP and 2iP) and disinfectant (sodium hypochlorite and mercury chloride) for *in vitro* establishment of shoot meristems. As a result, the most responsive clones for meristem culture were F1 and F2; the WPM culture medium supplemented with 8.8 µM 2iP, 0.2 µM NAA and 3 g.L⁻¹ activated charcoal was the most suitable for the *in vitro* establishment of F1 clone. There was no significant phytotoxic effect of the tested disinfecting agents. Furthermore, we identified an endophytic bacteria isolated from the meristem: *Agrobacterium larrymoorei*. In a second step, the extracted metabolites of yerba mate buds were studied. For this purpose, freshly collected buds were used and, after extraction and derivatization of the compounds, the samples were analysed using a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer. The analysis indicated the presence of phenolic acids such as caffeic and chlorogenic acids, monosaccharides such as glucose, fructose and ribose; disaccharides such as maltose and sucrose and sugar alcohols such as mannitol and inositol.. In conclusion, the establishment *in vitro* of shoot meristems of yerba mate was possible and for the first time, the endophytic bacteria *A. larrymoorei* was isolated from shoot meristems of yerba mate. Moreover, differences between the compounds present in the buds of different genotypes were confirmed, and a hypothesis was formulated to explain these differences, according which the clones may be stressed in a semi- hydroponic system. F1 clone, when introduced *in vitro*, would be the genotype more difficult to establish due to the higher concentration of caffeic and chlorogenic acids present in the buds.

Key Words: *Agrobacterium larrymoorei*, activated charcoal, 2iP, phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE MERISTEMAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A.ST-HIL) E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIA ENDOFÍTICA

- FIGURA 1 - ANÁLISE HISTOLÓGICA DO METISTEMA BROTADO E MERISTEMA COM FORMAÇÃO DE CALOS.....60
- FIGURA 2 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ISOLADO ENDOFÍTICO DE *Ilex paraguariensis*, BASEDA NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO DO GENE 16S rRNA BASEADO POR MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA.....62
- FIGURA 3 - FOTOMICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE *Agrobacterium larrymoorei* NOS TECIDOS INTERNOS DO MERISTEMA ISOLADO AOS 30 DIAS *IN VITRO*.....62

CAPÍTULO 2 – METABÓLITOS POLARES DE GEMAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A.ST-HIL)

- FIGURA 1 – BILOT GERADOS PELA ANÁLISE DE PCA.....84

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE MERISTEMAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A.ST-HIL) E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIA ENDOFÍTICA

TABELA 1	–	SIGNIFICÂNCIA DO TESTE ESCORE MÉDIO (QS) PARA AS VARIÁVEIS CATEGÓRICAS COLORAÇÃO E ESTADO ENTRE OS TRATAMENTOS.....	54
TABELA 2	–	COLORAÇÃO (VERDE, AMARELO E MARROM) E ESTADO (ESTAGNADO E INTUMESCIDO) DE MERISTEMAS DE ERVA-MATE APÓS 30 E 60 DIAS DE CULTURA EM DIFERENTES MEIOS COM 0,1 µM de ANA e 2,2 µM de BAP.....	55
TABELA 3	–	SIGNIFICÂNCIA DO TESTE ESCORE MÉDIO (QS) PARA A VARIÁVEL CATEGÓRICA COLORAÇÃO VERDE OU MARRON (OXIDADO) DOS MERISTEMAS ENTRE OS CLONES F1, F2, A03 E A07.....	55
TABELA 4	–	COLORAÇÃO VERDE OU MARRON (OXIDADO) DE MERISTEMAS DE ERVA-MATE PARA OS CLONES F1, F2, A03 e A07 AOS 30 e 60 DIAS DE CULTURA EM MEIO DE CULTURA WPM COM 0,1 µM de ANA e 2,2 µM de BAP.....	56
TABELA 5	–	SIGNIFICÂNCIA DO TESTE ESCORE MÉDIO (QS) PARA A VARIÁVEL CATEGÓRICA COLORAÇÃO (VERDE OU MARRON (OXIDADO)) DOS MERISTEMAS ENTRE OS TRATAMENTOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARVÃO ATIVADO.....	56
TABELA 6	–	COLORAÇÃO VERDE OU MARRON (OXIDADO) DE MERISTEMAS DE ERVA-MATE AOS 60 DIAS DE CULTURA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARVÃO ATIVADO ADICIONADO AO MEIO DE CULTURA WPM COM 0,2 µM DE ANA E 2,2 µM DE BAP PARA O CLONE F1.....	57
TABELA 7	–	COLORAÇÃO (VERDE OU MARROM) E ESTADO (INTUMESCIDO, ESTAGNADO, OU COM CALOS) DOS MERISTEMAS DE ERVA-MATE EM FUNÇÃO DA CITOCININA ADICIONADA AO MEIO DE CULTURA WPM COM 3 g.L ⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO E 0,2 µM DE ANA.....	58
TABELA 8	–	EFEITO DO AGENTE DESINFESTANTE SOBRE O ESTADO DE MERISTEMAS DE ERVA-MATE PARA O CLONE F1 APÓS 30 E 60 DIAS DE CULTURA EM MEIO WPM, 3 g.L ⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO, 8,8 µM DE 2IP E 0,2 µM DE ANA.....	59
TABELA 9	–	LINHAGENS DE REFERÊNCIA.....	61

CAPÍTULO 2 – METABÓLITOS POLARES DE GEMAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A.ST-HIL)

TABELA 1	–	LISTA DE COMPOSTOS IDENTIFICADOS EM GEMAS DE ERVA-MATE, REFERENTE A FIGURA 1B.....	82
TABELA 2	–	SIGNIFICÂNCIA DO TESTE F PARA OS COMPOSTOS MONOSSACARÍDEO GLICOSE, AÇÚCAR, ÁLCOOL, MANITOL E DISSACARÍDEO MALTOSE.....	85

TABELA 3	–	ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS COMPOSTOS MONOSSACARÍDEO GLICOSE, AÇÚCAR ÁLCOOL MANITOL E DISSACARÍDEO MALTOSE ENTRE OS CLONES F1, F2, A03 E A07.....	85
TABELA 4	–	SIGNIFICÂNCIA DO TESTE F PARA OS COMPOSTOS ÁCIDO CAFÉICO, ÁCIDO CLOROGÊNICO, ÁCIDO QUÍNICO E ÁCIDO SALICÍLICO.....	86
TABELA 5	–	ABUNDÂNCIA RELATIVA PARA OS COMPOSTOS ÁCIDO CAFÉICO, ÁCIDO CLOROGÊNICO, ÁCIDO QUÍNICO E ÁCIDO SALICÍLICO ENTRE OS CLONES F1, F2, A03 E A07.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	Ácido 3-indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftaleno acético
ANOA	Ácido naftoxiacético
B5	Meio de cultura (GAMBORG et al., 1968)
BAP	6-benzilaminopurina
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
CIN	Cinetina (6-furfurilaminopurina)
2,4D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
gl	Número de graus de liberdade
2iP	2-isopenteniladenina
LB	Meio de cultura “Luria Broth” (SOMASEGARAN e HOBEN, 1994)
MS	Meio de cultura de MURASHIGE e SKOOG (1962)
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide
OM	Meio de cultura de RUGINI (1984)
PC	Componente principal
PCA	Análise de componentes principais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PICLORAM	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
PPZ	3-metill-1-fenil-2-pirazolin-5-one
PVP	Polivinilpirrolidona
QL	Meio de cultura de QUOIRIN e LEPOIVRE (1977)
Qs	Escore médio
RT	Tempo de retenção em min
TDZ	Tidiazuron (1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) uréia)
WPM	Meio de cultura de LLOYD e MCCOWN (1980)
χ^2	Qui-quadrado
ZEA	Zeatina (N-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enil) aminopurina)

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA (mg.L⁻¹).....	93
ANEXO 2 – COMPOSIÇÃO IÔNICA DOS MEIOS DE CLTURA.....	93
ANEXO 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA LB PARA CRESCIMENTO BACTERIANO.....	94
ANEXO 4 – DESDOBRAMENTO DA ANÁLISE DO EXPERIMENTO NOMEADO EFEITO DE CITOCININA ASSOCIADA A AUXINA ANA.....	94
ANEXO 5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DO EXPERIMENTO NOMEADO EFEITO DO AGENTE DESINFESTANTE.....	94

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 <i>Ilex paraguariensis</i> A. ST- HIL.....	19
2.2 CULTURA DE MERISTEMAS <i>IN VITRO</i>	21
2.3 PRINCIPAIS ASPECTOS RELACIONADOS A CULTURA DE TECIDOS.....	22
2.3.1 Desinfestação do material vegetal.....	22
2.3.2 Oxidações fenólicas e antioxidantes.....	23
2.3.3 Meio de cultura e reguladores vegetais.....	25
2.4 MICROPROPAGAÇÃO DA ERVA-MATE (<i>Ilex paraguariensis</i>) A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS.....	27
2.4.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> e indução de brotações.....	27
2.4.2 Multiplicação.....	28
2.4.3 Enraizamento.....	29
2.4.4 Aclimatização.....	30
2.5 MICROPROPAGAÇÃO DE OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Ilex</i> A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS.....	30
2.6 MANIFESTAÇÕES ENDOFÍTICAS.....	31
2.7 METABOLOMA DE PLANTAS.....	33
2.8 REFERÊNCIAS.....	34
3 CAPÍTULO 1 – ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE MERISTEMAS DE ERVA- MATE (<i>Ilex paraguariensis</i> A.ST-HIL) E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIA ENDOFÍTICA.....	44
RESUMO.....	44
3 CHAPTER 1 – <i>IN VITRO</i> ESTABLISHMENT OF YERBA MATE SHOOT MERISTEMS (<i>Ilex paraguariensis</i> A.ST-HIL) AND IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA.....	44
ABSTRACT.....	44

3.1 INTRODUÇÃO.....	45
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.2.1 Local de pesquisa e coleta do material vegetal.....	47
3.2.2 Desinfestação e tratamento dos segmentos nodais.....	48
3.2.3 Cultura de meristemas.....	48
3.2.3.1 Excisão dos meristemas.....	48
3.2.3.2 Meios e condições de cultura.....	48
3.2.3.3 Efeito dos meios de cultura.....	49
3.2.3.4 Efeito do genótipo.....	49
3.2.3.5 Efeito da concentração de carvão ativado.....	49
3.2.3.6 Efeito de citocininas associadas a auxina ANA.....	50
3.2.3.7 Efeito do agente desinfestante.....	50
3.2.4 Delineamento experimental e análise estatística.....	50
3.2.5 Análise histológica.....	51
3.2.6 Análise ultra estrutural.....	51
3.2.7 Estudo de bactéria endofítica.....	51
3.2.7.1 Isolamento e identificação de bactéria endofítica.....	51
3.2.7.2 Alinhamento e construção filogenética.....	53
3.3 RESULTADOS.....	53
3.3.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> de meristemas de erva-mate.....	53
3.3.1.1 Efeito do meio de cultura.....	53
3.3.1.2 Efeito do genótipo.....	55
3.3.1.3. Efeito da concentração de carvão ativado.....	56
3.3.1.4 Efeito de citocinina associada a auxina ANA.....	57
3.3.1.5 Efeito do agente desinfestante.....	58
3.3.2 Análise histológica.....	59
3.3.3 Identificação de bactéria endofítica.....	60
3.4 DISCUSSÃO.....	63

3.4.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> de meristemas de erva-mate.....	63
3.4.2 Identificação de bactéria endofítica.....	66
3.5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES.....	68
3.6 REFERÊNCIAS.....	68
4 CAPÍTULO 2 – METABÓLITOS POLARES DE GEMAS DE ERVA-MATE (<i>Ilex paraguariensis</i> A.ST-HIL)	77
RESUMO.....	77
4 CHAPTER 2 – POLAR METABOLITES OF YERBA MATE BUDS (<i>Ilex paraguariensis</i> A.ST-HIL).....	77
ABSTRACT.....	77
4.1 INTRODUÇÃO.....	78
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	79
4.2.1 Local de pesquisa e coleta do material vegetal.....	79
4.2.2 Análise de metabólitos polares.....	80
4.2.2.1 Amostragem, extração e derivatização.....	80
4.2.2.2 Análise por CG-MS.....	81
4.2.2.3 Tratamento dos dados e base de dados.....	81
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
4.4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES.....	88
4.5 REFERÊNCIAS.....	88
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92

1 INTRODUÇÃO GERAL

Ilex paraguariensis A.St-Hil conhecida popularmente como erva-mate é uma espécie de ocorrência natural do Brasil, Argentina, Paraguai, e pontos menos expressivos no Uruguai (OLIVEIRA e ROTTA, 1983). Possui grande importância econômica, social e ambiental para a região sul do Brasil. Atualmente, obtém-se os mais diversos produtos das folhas da planta, dentre eles o chá mate.

Os problemas com os quais se depara o cultivo a partir de sementes de erva-mate, são decorrentes da dormência embrionária, do longo tempo destinado a estratificação (5 a 6 meses) e da germinação demorada, desuniforme e em baixo percentual (de 5 a 20%) (HU, 1975; ZANON, 1988). A macropropagação por estaquia também apresenta limitações para adoção em escala comercial, principalmente em relação a métodos eficientes de rejuvenescimento entre outros aspectos (SANTOS e WENDLING, 2010). Frente a esta problemática a micropropagação é uma alternativa, pois, além de possibilitar a obtenção de um grande número de plantas por meio da multiplicação, possibilita a manutenção das bases genéticas do material vegetal selecionado em programas de melhoramento genético (SILVA et al., 2003; BERTOZZO e MACHADO, 2010).

A capacidade regenerativa dos explantes é altamente dependente do genótipo utilizado. Tal característica faz com que seja necessário desenvolver protocolos de regeneração específicos para cada material vegetal, buscando otimizar a resposta *in vitro* (COSTA et al., 2001; PINHO et al., 2010).

A maioria dos trabalhos citados na literatura para erva-mate utiliza material vegetal juvenil e não selecionado (DUTRA e SILVA, 2009) e tem como fonte de explantes principalmente segmentos nodais (SANSBERRO et al., 1999; SANSBERRO et al., 2000; HÖRNER et al., 2001; SANSBERRO et al., 2001A; ZANIOLO e ZANETTE 2001; GRIEBELER et al., 2014). A maior dificuldade de estabelecimento de segmentos nodais *in vitro* é a grande taxa de contaminação e oxidação inicial dos tecidos (HORBACH, 2008).

Visando reduzir as taxas de contaminação e oxidações, a utilização de meristemas é uma alternativa, tendo como principal vantagem a eliminação de microrganismos patogênicos principalmente vírus, que muitas vezes podem estar presentes na planta doadora (GROUT, 1999; GEORGE, 2008). A Identificação de vírus em erva-mate foi relatada no ano de 2014, sendo proposta a nomenclatura

para o vírus de *Yerba mate endornavirus* (DEBAT et al., 2014). Há apenas um relato da introdução de meristemas *in vitro* da espécie, no qual foi verificada a morte dos explantes ao fim de 60 dias de cultivo (SANSBERRO et al., 1999).

O aparecimento de microrganismos endofíticos (manifestação endofítica) após alguns subcultivos dos explantes *in vitro*, pode influenciar o desenvolvimento e processos morfogênicos da planta (ESPOSITO-POLESI et al., 2015). Assim, esse tema apresenta ligação direta com a cultura de tecidos, e a identificação dos microrganismos é o primeiro passo para o entendimento da influência destes sobre as respostas dos explantes *in vitro*. As bactérias endofíticas já foram identificadas em segmentos nodais de *Ilex paraguariensis* (LUNA et al., 2013), assim como em *Ilex dumosa* (LUNA et al., 2008), as quais afetaram negativamente o cultivo *in vitro*.

Outro ponto chave para a compreensão dos fatores que afetam o estabelecimento do material vegetal introduzido *in vitro* é a identificação e quantificação dos metabólitos que estão presentes nos tecidos das plantas e sua influência na resposta dos explantes. A metabolômica de plantas é ainda um campo novo, mas de muita valia, já que é capaz de diferenciar genótipos e fenótipos baseados nos teores de metabólitos presentes nos tecidos analisados (FRAIGE, 2012).

O objetivo geral do capítulo 1 foi o estabelecimento *in vitro* de meristemas de erva-mate e identificação de bactéria endofítica presente nestes explantes, tendo como objetivos específicos: determinar o melhor clone comercial (F1, F2, A03 ou A07), meio de cultura, citocinina, concentração do antioxidante carvão ativado e agente desinfestante para o estabelecimento *in vitro* dos meristemas, assim como, inferir sobre como a bactéria endofítica pode estar influenciando o estabelecimento dos meristemas *in vitro*. O objetivo geral do capítulo 2 foi a identificação e quantificação dos compostos polares presentes em gemas coletadas de minicepas mantidas em casa de vegetação no sistema semi-hidropônico de quatro clones comerciais de erva-mate denominados F1, F2, A03 e A07 com o objetivo específico de realizar inferências a respeito da influência destes metabólitos no estabelecimento destas gemas, caso elas fossem introduzidas *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil

A família botânica Aquifoliaceae compreende mais de 700 espécies do gênero *Ilex* (GIBERTI, 1995). As plantas deste gênero incluem árvores decíduas, perenes ou arbustos, tendo sua distribuição geográfica nas regiões tropicais e temperadas de ambos os hemisférios (HU, 1989).

Ilex paraguariensis é uma espécie de ocorrência natural do Brasil, Argentina, Paraguai e pontos menos expressivos no Uruguai. Geograficamente *I. paraguariensis* tem ocorrência natural desde a latitude de 21° até 30° S e longitudes de 48°30' até 56°10' W, coordenadas que correspondem a uma área de abrangência de 540.000 km². No Brasil, tem representantes nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (OLIVEIRA e ROTTA, 1983), onde é conhecida popularmente por erva-mate.

I. paraguariensis é característica de Floresta Ombrófila Mista (Floresta de Araucária), penetra na floresta estacional semidecidual no nordeste do Paraná e no Sul do Mato Grosso do Sul, sendo uma espécie clímax tolerante a sombra. A espécie varia de arvoreta a árvore perenifólia, podendo atingir até 30 m de altura quando não manejada e de três a cinco metros de altura quando cultivada (CARVALHO, 2003).

É uma planta dióica com flores diclinas de coloração branca, com um dos sexos abortivos, ou seja, embora em todas as flores existam estames e pistilos, nas flores femininas os estames não funcionam e nas masculinas o pistilo aborta o grão de pólen (CARVALHO, 2003). Suas folhas são coriáceas, os frutos do tipo bagas glabras lisas com sementes duras; a madeira é leve e mole, pouco compacta, de baixa durabilidade natural (LORENZI, 2002).

No Brasil, a floração ocorre de setembro a outubro no estado do Rio Grande do Sul; de setembro a novembro no Paraná; de setembro até dezembro em Santa Catarina e apenas no mês de novembro no estado de São Paulo, enquanto que seus frutos amadurecem de dezembro a abril no Rio Grande do Sul; de dezembro a março em Santa Catarina; de janeiro a abril no Paraná e em março no estado de São Paulo. O processo reprodutivo inicia em árvores plantadas oriundas de propagação vegetativa, dois anos após o plantio e em árvores provenientes de

sementes por volta dos cinco anos de idade, em sítios adequados (CARVALHO, 2003).

Os problemas com os quais se depara o cultivo a partir de sementes são a produção de plantas muito heterogêneas, o baixo poder germinativo (comumente 5 a 20%) e o tempo excessivamente longo de sua germinação (HU, 1975; ZANON, 1988). O gênero *Ilex* tem sementes dormentes por imaturidade embrionária, além de dormência tegumentar, devendo passar por um período de estratificação em areia (FOWLER e STURION, 2000). Verifica-se que a maior porcentagem dos embriões nas sementes, permanecem estagnados no estágio de coração (NIKLAS, 1987), sendo que o desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate demonstra correlação com a latitude da área de origem dos frutos. Quando se comparou sementes oriundas dos estados do Paraná das cidades de (Campo Mourão, Toledo e Cascavel) e do Rio Grande do Sul da cidade de (Soledade), notou-se que as sementes do Paraná (mais ao norte) apresentaram maior desenvolvimento do embrião, fato explicado pela menor latitude, temperatura e insolação, resultando em maior desenvolvimento embrionário (FOWLER et al., 2007).

Com relação a macropropagação por estaquia, a espécie apresenta limitações para sua adoção em escala comercial, principalmente em relação a métodos eficientes de rejuvenescimento de material adulto, ao desenvolvimento das técnicas de manejo do ambiente de propagação (substratos, umidade na folha e no substrato, controle fúngico e hormonal), manejo das estacas pós enraizamento em relação a nutrição (tipos de adubos, dosagens, intensidade de aplicação, relações de nutrientes etc.), sistemas de enraizamento e condução que não necessitem de transplante para as estacas enraizadas, sombreamento e vigor do sistema radicular (SANTOS e WENDLING, 2010).

A erva-mate é uma planta que apresenta grande potencial econômico, social e ecológico para a região Sul do Brasil. Sua matéria prima provém principalmente de pequenas e médias propriedades rurais dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (ROSSA, 2013). O processo exploratório está fundamentado na colheita dos ramos da planta, para obtenção das folhas, que colhidas e processadas dão origem principalmente a bebidas tônicas e estimulantes feitas por infusão a quente, o “chimarrão”, ou a frio, o “tererê”; e das folhas tostadas, as quais dão origem ao “chá mate” (SAIDELLES et al., 2010).

2.2 CULTURA DE MERISTEMAS *IN VITRO*

Meristemas são grupos de células pequenas e isodiamétricas com características embrionárias (TAIZ e ZEIGER, 2009). Um dos principais atributos destas células é sua atividade de centro organogenético, responsável pelas características de crescimento das plantas (BARTON, 1998; BOLDUC e HAKE, 2009). Assim, as funções básicas das células meristemáticas são: atuar como células pluripotentes e como sítio de padrão de formação (BARTON, 1998).

A essência da cultura de meristemas *in vitro*, é referente à remoção do ápice meristemático de uma gema da planta matriz selecionada e posterior cultivo *in vitro*. O explante excisado consiste no domo meristemático e um número reduzido de primórdios foliares, sendo livre de qualquer tecido vascular (GROUT, 1999). A maior vantagem da cultura de meristemas consiste na remoção de organismos patogênicos principalmente vírus, que muitas vezes estão presentes na planta doadora (GROUT, 1999; GEORGE, 2008).

A utilização de meristemas com foco na obtenção de plantas livre de vírus é citada na literatura para muitas plantas como alho (*Allium sativum*) (CONCI e NOME, 1991), cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) (CHATENET et al., 2001), bamboo (*Bambusa oldhamii*) (HSU et al., 2000), crisântemo (*Chrysanthemum morifolium*) (VERMA et al., 2004; KUMAR et al., 2009), cardo (*Cynara cardunculus*) (ACQUADRO et al., 2010) e pimentão (*Capsicum annuum*) (MEENA et al., 2014). Muitos trabalhos utilizam meristemas com foco específico para micropropagação, assim como para redução de contaminações por fungos e bactérias, tanto para espécies anuais como arbóreas, como em feijão (*Phaseolus vulgaris*) (GRUM et al., 1998), pinus (*Pinus radiata*) (PREHN et al., 2003), cana de açúcar (*S. officinarum*) (CHA-UM et al., 2006), feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) (AASIM et al., 2008), teca (*Tectona grandis*) (ANDRAE et al., 2010), jacarandá da bahia (*Dalbergia nigra*) (SARTOR et al., 2013), pereira (*Pyrus glabra*) (PARDAZ et al., 2015), capim-pé-de-galinha-gigante (*Eleusine coracanae*) (Satish et al., 2015) e mamoeiro (*Carica papaya*) (GATAMBIA et al., 2016). Meristemas também foram utilizados para iniciar a cultura de calos de tamareira (*Phoenix dactylifera*) (ALI e ALI, 2015).

A regeneração de plantas a partir de meristemas é uma das técnicas considerada promissora para propagação de material vegetal selecionado, devido à manutenção genética dos indivíduos propagados (KUMAR et al., 2015), porém

muitos fatores influenciam o sucesso da técnica, sendo o tamanho do explante um dos fatores mais importante e dependente do objetivo proposto. O tamanho do meristema excisado está relacionado com a presença de organismos patogênicos e na regeneração dos explantes, e tais respostas são ainda dependentes do genótipo introduzido *in vitro* (CHA-UM et al., 2006). Os mesmos autores verificaram que meristemas excisados de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) com tamanho de 1,5 mm, apresentaram maior taxa de contaminação por bactérias, e que explantes com 0,5 mm foram menos responsivos *in vitro*, porém, eficientes para obtenção de culturas livre de doenças.

Para pereira (*Pyrus* spp), quando comparadas gemas axilares com meristemas axilares, a taxa de contaminação com fungos foi estatisticamente inferior nos explantes do tipo meristemas, mas a regeneração dos explantes foi dependente da cultivar introduzida *in vitro* (ERIG e FORTES, 2002). Resultados de sobrevivência *in vitro* de meristemas de cerejeira (*Prunus avium*) também foram dependentes da cultivar no estudo de MOGHADAM e ZAMANIPOUR. (2015).

Meristemas de erva-mate (*I. paraguariensis*) foram introduzidos *in vitro* em meio semi-sólido ¼ MS com diferentes concentrações de ANA e BAP, porém não houve estabelecimento da cultura, sendo que todos os meristemas morreram ao fim de 60 dias de cultivo *in vitro* (SANSBERRO et al., 1999).

2.3 PRINCIPAIS ASPECTOS RELACIONADOS A CULTURA DE TECIDOS

2.3.1 Desinfestação do material vegetal

A desinfestação do material vegetal é realizada para erradicação de microrganismos existentes na superfície do explante, oriundo de material de campo ou de casa de vegetação, com a utilização de produtos químicos (CID e TEIXEIRA, 2010). Alguns dos produtos utilizados são etanol, hipoclorito de sódio (NaOCl), hipoclorito de cálcio (Ca(ClO)₂) ou cloreto de mercúrio (HgCl₂) (PIERIK, 1997).

Apesar dos tecidos mais jovens demonstrarem melhor estabelecimento *in vitro*, são mais suscetíveis à toxicidade dos agentes desinfestantes, que podem causar danos aos tecidos. Assim a utilização de concentrações baixas é preferível (SMITH, 2000). Concentrações elevadas de cloro ativo como 2%, resultaram em 100% de oxidação para explantes do tipo rizoma de bananeira (*Musa* sp), enquanto que com

1% a oxidação diminuiu para 80% e, com 0,5% de cloro ativo a oxidação foi reduzida para 10% porém, neste tratamento houve altas taxas de contaminações, tornando inviável a cultura com a utilização de 0,5% de cloro ativo (PEREIRA et al., 2015).

A determinação da concentração do agente desinfestante e do tempo de desinfestação depende muito da espécie e tipo de explante, sendo necessário testes preliminares para definição de um protocolo de desinfestação que resulte em baixas percentagens de contaminações e manutenção de um número adequado de explantes viáveis.

2.3.2 Oxidações fenólicas e antioxidantes

A produção de substâncias marrons nos tecidos das plantas *in vitro* é causada principalmente pela oxidação enzimática de compostos fenólicos (ZHOU et al.; 2010; SARTORI et al., 2013) ocasionando, não raramente, a morte dos explantes pela produção de substâncias tóxicas (quinonas) e pela obstrução do tecido oxidado, resultando na não absorção dos nutrientes do meio de cultura pelos tecidos (COSTA et al., 2006; KARIYANA e KARIYANA, 2013). Buscando solucionar o problema, alguns produtos com ação antioxidante são adicionados ao meio de cultura e/ou utilizados na imersão do explante antes da inoculação. Dentre eles pode-se citar ácido-ascórbico, ácido cítrico, carvão ativado, PVP entre outros.

O ácido ascórbico age como redutor e atua capturando o oxigênio molecular do peróxido de hidrogênio, superóxidos, hidroxilas e outros radicais oxigenados (ALI e ALQURAINY, 2006); já o ácido cítrico apresenta ação quelante, ou seja, aprisiona o cobre da enzima PPO (CID e TEIXEIRA., 2010).

O carvão ativado é um adsorvente forte (ZHOU et al.; 2010) apresentando maior adsorção de compostos aromáticos, como é o caso dos produtos resultantes do processo oxidativo e polifenóis, mas também auxinas e citocininas (PAN e STADEN, 1998); já o PVP atua prevenindo a oxidação e polimerização de compostos fenólicos. Sua propriedade de captar elétrons é sua principal vantagem (CID e TEIXEIRA, 2010A).

Trabalhos comparando o efeito de antioxidantes adicionados ao meio de cultura ou imersão dos explantes antes da introdução *in vitro*, são citados na literatura para plantas de diferentes hábitos e para diferentes tipos de explantes, como pode ser revisado no decorrer do texto abaixo.

A imersão dos explantes em solução antioxidante de ácido ascórbico e ácido cítrico por uma hora antes da extração de meristemas, foi um procedimento padrão adotado para cerejeira (*Prunus avium*) (MOGHADAM e ZAMANIPOUR, 2015); em macieira (*Malus sylvestris*), antes da extração dos meristemas, o material vegetal permaneceu imerso em solução de ácido ascórbico por 15 min (RIBAS e ZANETTE, 1992).

Para pereira (*Pyrus glabra*) a adição de PVP ao meio de cultura na concentração de 200 mg.L⁻¹, resultou em 25% de meristemas estabelecidos ao fim de 28 dias de cultura (PARDAZ et al., 2015). No estudo com jacarandá da bahia (*Dalbergia nigra*), foi testado o efeito dos antioxidantes PVP e carvão ativado na concentração de (1 g.L⁻¹) no meio de cultura para o estabelecimento *in vitro* de meristemas, mas, ao final do período de 8 semanas não houve diferença entre os resultados, sendo as altas taxas de oxidações (máxima de 70%) justificadas por se tratar de uma espécie lenhosa e que, provavelmente necessite de concentrações mais elevadas de antioxidante (SARTOR et al., 2013). Para meristemas de teca (*Tectona grandis*) o uso de 3 g.L⁻¹ de carvão ativado na etapa de estabelecimento dos meristemas, foi essencial para obtenção de 60% de meristemas viáveis para as próximas etapas de cultivo *in vitro* (ANDRADE, 2010); a mesma concentração de carvão ativado (3 g.L⁻¹) também foi indicada para o estabelecimento de segmentos nodais de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*) reduzindo a taxa de oxidação de 50% para 1,8% (COSTA et al., 2007).

Para plantas oriundas de sementes *in vitro* de orquídeas (*Schomburgkia crispa*), a utilização de carvão ativado nas concentrações de 0,5, 1 ou 2 g.L⁻¹ foi a mais indicada para o controle da oxidação quando comparado com ácido ascórbico e ácido cítrico (SOUZA et al., 2014). Para regeneração *in vitro* de várias espécies de pimenta (*Piper* spp), o uso de carvão nas concentrações de 1, 2 e 2,5 g.L⁻¹, mostrou-se mais adequado para controle da oxidação de algumas das espécies estudadas apresentando variação de oxidação de 12,5 a 95 % (MADHUSUDHANAN e RAHIMAN, 2000). A adição de ácido ascórbico no meio de cultura na concentração de 0,1 g.L⁻¹ foi padrão para todos os experimentos com segmentos nodais e ápices caulinares de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (EMAM e ASSAREH, 2015).

A escolha do melhor antioxidante depende muito da espécie introduzida *in vitro*, do tipo de explante e vários outros fatores relacionados ao meio de cultura e condições da cultura, sendo necessária a realização de experimentos buscando

encontrar o melhor antioxidante e concentração específicos para o genótipo e explante utilizado.

2.3.3 Meio de cultura e reguladores vegetais

Os meios de cultura fornecem os macronutrientes (N, P, S, Ca, Mg, K) que são aqueles que as plantas necessitam em maiores quantidades, e os micronutrientes (Fe, Mn, Cu, Zn, Bo, Mo) que são exigidos em menores proporções. Ambos são essenciais para o pleno crescimento vegetal *in vitro* como *ex vitro*, além de C, O e H. Os meios de cultura também são fontes de vitaminas e aminoácidos, sendo as principais delas a tiamina (vitamina B1), piridoxina (vitamina B6) e ácido nicotínico (vitamina B3). Como fonte de carbono, o mais comum é a utilização de sacarose, uma vez que os tecidos inicialmente verdes perdem seus pigmentos quando isolados *in vitro*, necessitando de uma fonte de carbono para sua sobrevivência. Mesmo tecidos verdes ou que adquirem pigmentos durante o período de cultivo não são autotróficos (BHOJWANI e RAZDAN, 1983).

O pH dos meios de cultura, geralmente está entre 5 e 6, sendo tais valores ajustados com HCl (ácido clorídrico) ou NaOH (hidróxido de sódio). Valores de pH mais baixos (meios mais ácidos) dificultam a utilização do amônio pelos tecidos, enquanto valores mais altos de pH diminuem a utilização de nitrato. O pH é ajustado antes da adição do agente geleificante, neste caso para obtenção de meios de cultura semi-sólidos. O agente geleificante mais usual é o ágar, um polissacarídeo extraído de algas marinhas, porém existem outras classes de agentes geleificantes que são gomas produzidas por bactérias como o gelrite (CALDAS et al., 1998).

Existem muitas formulações de meio de cultura, as quais são compostas pelos macro e micronutrientes, aminoácidos, vitaminas e fonte de carbono acima descritos. Algumas dessas formulações são o meio White (1943), MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), B5 (GAMBORG et al., 1968) e WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), sendo que o meio WPM foi desenvolvido principalmente para espécies lenhosas. Juntamente ao meio de cultura, normalmente são adicionados reguladores vegetais, sendo os mais usuais na cultura de tecidos os da classe das auxinas e citocininas.

As auxinas apresentam uma gama enorme de efeitos fisiológicos, mas seu efeito típico é o envolvimento no alongamento celular e sua interação sinérgica com citocininas na regulação do processo de divisão celular. Esses dois

reguladores, quando aplicados exógenamente, controlam a organogênese de raízes e ramos em cultura de tecidos vegetais. O efeito é dependente da razão entre auxinas e citocininas, sendo que uma alta concentração de auxinas induz a formação de raízes, enquanto que uma alta concentração de citocininas induz o desenvolvimento de brotações. Entre as auxinas pode-se citar AIA, ANA, AIB, 2,4D, Picloram e ANOA e citocininas como: CIN, BAP, 2iP, ZEA e TDZ (CALDAS et al., 1998).

A escolha do meio de cultura e reguladores vegetais depende da melhor resposta dos explantes *in vitro*. Para cultura de meristemas do lírio de fogo (*Gloriosa superba*) o meio MS foi utilizado em todas as etapas do cultivo *in vitro*, porém, a adição de BAP e ANA ao meio de cultura nas concentrações de 2,0 mg.L⁻¹ e 0,5 mg.L⁻¹ respectivamente, foram essenciais para obtenção de 90% de explantes que desenvolveram brotações (KHANDEL et al., 2011). Para cultura de meristemas de teca (*Tectona grandis*) a utilização do meio MS com 1,5 mg.L⁻¹ de BAP resultou em 4,3 folhas por meristema introduzido *in vitro* (ANDRADE, 2010).

Para ápices caulinares do arbusto pascuíta (*Euphorbia leucocephala*), o meio WPM foi o mais indicado para cultura, uma vez que resultou em brotos mais grossos, folhas com maior conteúdo de clorofila, e maior acumulação de matéria seca, quando comparado com os meios MS, MS 25%, MS 50% e WPM com diferentes variações dos sais (MARTÍNEZ-VILLEGAS et al., 2015). Resultados superiores de sobrevivência de meristemas de cerejeira (*Prunus avium*) introduzidos *in vitro* (55,5% e 38,9% para cultivares “Hajyusefi” e “Zard” respectivamente) também foram superiores em meio WPM quando comparados com os meios MS e QL (MOGHADAM e ZAMANIPOUR, 2015). Para louro pardo (*Cordia trichotoma*) o meio WPM proporcionou maior estímulo no desenvolvimento de gemas axilares em comparação com o meio MS, sendo que, 63% das gemas induzidas desenvolveram brotações (MANTOVANI et al., 2001).

Para a espécie *Phoenix dactylifera* (tamara), ápices caulinares foram multiplicados em meio ½ MS, sendo os melhores resultados (12,8 brotações por explante) obtidos com 0,4 mg.L⁻¹ de 2iP em combinação com 0,2 mg.L⁻¹ ANOA, 0,2 mg.L⁻¹ IAA e 0,4 mg.L⁻¹ de cinetina; sendo que, o tratamento contendo apenas 2iP (0,8 mg.L⁻¹) e AIA (0,4 mg.L⁻¹) correspondeu a 9,6 brotações por explante (MEZIANI et al., 2015). Resultados positivos com 2iP também foram verificados para *Rehmannia elata*, sendo obtido um valor máximo de 9 brotações a partir de

segmentos nodais em meio MS, com 6 μM de 2iP e 0,57 μM de ANA (PIATCZAK et al., 2015). Para pau-branco (*Picconia azorica*) 91,2% dos segmentos nodais brotaram em meio OM (RUGINI, 1984) com 24,6 μM de 2iP (MENDONÇA et al., 2015).

2.4 MICROPROPAGAÇÃO DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS.

Segmentos nodais constituem a fonte de explante utilizada na maioria dos trabalhos encontrados na literatura para erva-mate *in vitro* (SANSBERRO et al., 1999; SANSBERRO et al., 2000; HÖRNER et al., 2001; SANSBERRO et al., 2001A; ZANIOLO e ZANETTE 2001; GRIEBELER et al., 2014). Para se chegar a um protocolo completo de micropropagação de erva-mate via segmentos nodais, as fases de indução das brotações no explante primário, estabelecimento das brotações após remoção do explante primário, multiplicação, enraizamento e aclimatização devem ser estabelecidas.

2.4.1 Estabelecimento *in vitro* e indução de brotações

Buscando verificar qual o melhor meio de estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de erva-mate, REY et al. (1991) testaram os meios MS, 1/2MS, e 1/4MS, livres de reguladores vegetais, e verificaram porcentagens mais elevadas de indução das brotações após 30 dias de cultura, assim como menor taxa de enegrecimento dos explantes em meio 1/4MS. Os autores apontaram que as concentrações mais baixas de nitratos no meio 1/4MS, tornam esse meio menos tóxico para os explantes que o meio MS completo, favorecendo seu desenvolvimento.

SANSBERRO et al. (1999) verificaram o desenvolvimento de brotações provenientes de segmentos nodais após 28 dias de cultivo em meio de cultura $\frac{1}{4}$ MS suplementado com 4,4 μM de BAP.

A variação da concentração de sacarose é citada na literatura, uma vez que a maior ou menor concentração afeta diretamente o potencial osmótico do meio de cultura (GEORGE, 2008). A utilização da concentração de 0,09 M ou 30,80 g.L^{-1} para explantes obtidos de plantas com 2 anos de idade, resultou em uma porcentagem máxima de regeneração de brotações (uma por explante) de 60%; já

para explantes obtidos de plantas de 20 anos de idade, a porcentagem máxima de regeneração (63% - uma por explante) foi observada em meio de cultura com 0,04M ou 13,69 g.L⁻¹. Quando 0,44 µM de BAP foi adicionado ao meio, assim como sacarose na concentração de 0,09 M ou 30,80 g.L⁻¹, a média de brotações por explante aumentou para 3 a 5 (SANSBERRO et al., 2000).

SANSBERRO et al. (2001A) estudaram o efeito de diferentes giberelinas (GA₁; GA₃; GA₄ e GA₇), adicionadas ao meio de cultura, e observaram que as giberelinas não são responsáveis pela indução das brotações em segmentos nodais, mas que GA₁ na concentração de 5 mg.L⁻¹ e GA₄ na concentração de 1 ou 5 mg.L⁻¹, induzem o alongamento de brotações maiores que 5 mm de comprimento.

HÖRNER et al. (2001) desenvolveram brotações de segmentos nodais de erva-mate em meio ¼ MS suplementado com 0,54 µM de ANA. Ao fim de 33 dias, constatou-se que 93,3% dos explantes apresentavam a parte aérea (uma brotação) formada, porém sem elongação. Após a passagem dos segmentos para meio ¼ MS com diferentes concentrações de BAP, observaram o aparecimento da segunda brotação ao fim de 3 dias e, aos 28 dias, 80% dos explantes alongaram.

2.4.2 Multiplicação

SANSBERRO et al. (1999), subcultivando por 6 semanas brotações provenientes de segmentos nodais em meio de cultura ¼ MS suplementado com 4,4µM de BAP, verificaram que 63% das brotações desenvolveram-se em plântulas.

ZANIOLO e ZANETTE (2001) cultivaram segmentos nodais em meio de cultura MS por 30 dias para avaliar contaminações e oxidações fenólicas. Após, as brotações desenvolvidas que apresentavam comprimento entre 2 e 3 cm, foram cortadas e transferidas para a fase de multiplicação por 90 dias em meio ½ WPM suplementado com BAP (8,87µM) sendo repicadas 3 vezes para meio fresco. Ao fim do terceiro subcultivo, o material vegetal gerou uma média de 3,75 brotações por explante.

Mais recentemente, HORBACH et al. (2011) micropropagaram erva-mate por meio de ápices caulinares, utilizando explantes obtidos do desenvolvimento de embriões zigóticos desenvolvidos *in vitro*. Esses autores obtiveram os melhores resultados de formação de brotações múltiplas em meio de cultura ¼ MS suplementado com 8,8 µM de BAP.

2.4.3 Enraizamento

O enraizamento é a última etapa para o pleno desenvolvimento *in vitro* das plantas antes da aclimatização.

Plântulas enraizadas de erva-mate foram obtidas em meio $\frac{1}{4}$ MS suplementado com $7,4 \mu\text{M}$ de ácido indol-3-butírico (AIB) por 10 dias; após, foram transferidas para meio fresco livre de fitorregulador, obtendo uma porcentagem de enraizamento de 63% (SANSBERRO et al., 1999).

SANSBERRO et al. (2000) obtiveram porcentagens de enraizamento entre 20 e 50% para explantes jovens (2 anos de idade), quando a base das brotações foi imergida em um pó de enraizamento, contendo 1% de AIB e 1% de PPZ; em seguida foram inoculadas em meio $\frac{1}{4}$ MS suplementado com 1% AIB; 2% PPZ e vermiculita, sendo a vermiculita adicionada em substituição do ágar. Já para explantes adultos (20 anos de idade), os autores obtiveram 5 a 20% de enraizamento. A base das brotações foi mergulhada no mesmo pó de enraizamento que os explantes jovens, após as brotações foram inoculadas em meio $\frac{1}{4}$ MS, suplementado com 1,5% AIB; 1% PPZ e vermiculita. Ao contrário de muitos trabalhos, os autores não removeram a fonte de explante que gerou as brotações, sendo realizado o enraizamento no próprio explante primário (segmento nodal).

ZANIOLO e ZANETTE (2001) afirmam ser eficiente para o enraizamento de brotações de erva-mate mantê-las por 12 dias em meio $\frac{1}{2}$ WPM suplementado com $14,7 \mu\text{M}$ de AIB (fase de indução), seguido da transferência do explantes para meio $\frac{1}{2}$ WPM isento de reguladores de crescimento, com a adição de 1g.L^{-1} de carvão ativado (fase de desenvolvimento), apresentando uma porcentagem de enraizamento de 86,2%.

Uma porcentagem de enraizamento de 22,8% foi observada em explantes de erva-mate (não clonal), cultivados em meio $\frac{1}{4}$ MS, suplementado com $4,9 \mu\text{M}$ de AIB e vermiculita (para fornecer sustentação) (HORNER et al., 2001).

HORBACH et al. (2011) verificaram não ser necessária a separação temporal das fases de indução e desenvolvimento das raízes de erva-mate. Esses autores obtiveram uma porcentagem de 87,5% de enraizamento ao fim de 30 dias de cultivo em meio $\frac{1}{4}$ MS semi-sólido suplementado com $4,92$ ou $7,38 \mu\text{M}$ de AIB. O maior comprimento das raízes, uma média de $4,10$ cm por explante, também foi observado neste meio.

2.4.4 Aclimatização

Existe uma gama de substratos de diferentes origens, que podem ser utilizados individualmente ou em combinações para a aclimatização, sendo a escolha dependente do material vegetal utilizado. SANSBERRO et al., (1999) utilizaram a combinação de perlita, turfa e areia na proporção 1:1:1, tendo 70% de sobrevivência do material vegetal. Em outro trabalho, SANSBERRO et al. (2000) optaram pela mistura de areia e solo na proporção 1:1, obtendo 60% de sobrevivência das mudas.

2.5 MICROPROPAGAÇÃO DE OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Ilex* A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS

MAJADA et al. (2000) estabeleceram um protocolo de micropropagação de *I. aquifolium* a partir de segmentos obtidos de embriões zigóticos desenvolvidos *in vitro*. Os autores obtiveram um desenvolvimento de 4 novas brotações por segmento em meio MS semi-sólido com 4,4 μM de BAP. No meio WPM com 4,9 μM de AIB, tendo como suporte ágar, vermiculita ou celulose, tiveram taxas de enraizamento de 72,5 ; 71,4 e 64,3% respectivamente.

SANSBERRO et al. (2001C), utilizando como fonte de explantes segmentos nodais das espécies *I. aquifolium*; *I. argentina*; *I. brasiliensis*; *I. brevicuspis*; *I. dumosa*; *I. integerrima*; *I. microdonta*; *I. pseudoboxus*; *I. taubertiana*; *I. theezans*, obtiveram ao fim de 45 dias, 8; 15; 0; 5; 3; 26; 15; 20; 3; 11% de brotações maiores que 5 cm respectivamente para essas espécies. O meio utilizado foi ¼ MS suplementado com 0,5 μM de BAP. Para enraizar as brotações, os autores seguiram o protocolo estabelecido em 1999, apresentando uma porcentagem de enraizamento que variou de 9 a 48%, dependendo da espécie.

Um protocolo de micropropagação para *I. dumosa* var. *dumosa* foi estabelecido por LUNA et al. (2003), os quais realizaram a fase de estabelecimento do segmento nodal em meio ¼ MS com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 4,4 μM de BAP. Na fase de multiplicação e alongamento das brotações, o meio foi o mesmo da fase de estabelecimento porém com sacarose reduzida para 15 g.L⁻¹. Durante a fase de enraizamento, a indução das raízes foi realizada em meio ¼ MS adicionado de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,25% de Phytigel e 7,3 μM de AIB seguido do desenvolvimento das raízes em meio livre de AIB, com 20 μM de cadaverine.

Para a espécie *I. glabra*, um protocolo de micropropagação foi estabelecido por SUN et al. (2010) os quais apontam que os melhores resultados para indução de brotações a partir de segmentos nodais foram observados em meio MS com 90 mM de sacarose. Os autores testaram diferentes citocininas para obtenção de brotações, contudo os melhores resultados foram obtidos quando as brotações foram cultivadas em meio MS suplementado com 4,5 μ M de zeatina para multiplicação e alongamento. O enraizamento foi realizado em meio $\frac{1}{4}$ MS com 10,3 μ M de AIB e, finalmente, a fase de aclimatização foi realizada em substrato de peatmoss e perlita na proporção de 1:1. Com tal protocolo, os autores obtiveram 95% de sobrevivência das mudas micropropagadas.

A espécie *I. khasiana* teve seu primeiro protocolo de estabelecimento *in vitro* realizado por DANG et al. (2011) que utilizaram segmentos provenientes de sementes germinadas *in vitro*. Os autores obtiveram uma taxa de regeneração de 86,66% em meio de cultura MS com 8,88 μ M de BAP e 4,64 μ M de cinetina, apresentando em média 10,20 brotações por explante. O enraizamento foi obtido com sucesso em meio $\frac{1}{2}$ MS com 9,84 μ M de AIB, apresentando uma porcentagem de enraizamento de 93,33% e um número médio de raízes por explantes de 5,56. Ao fim dos trabalhos, os autores atingiram 70% de sobrevivência das mudas aclimatizadas.

2.6 MANIFESTAÇÕES ENDOFÍTICAS

A manifestação microbiana tem sido muitas vezes confundida na literatura com contaminação microbiana. A contaminação microbiana aparece nos primeiros dias de cultivo *in vitro*, sendo caracterizada pelos microrganismos epifíticos; já a manifestação microbiana ocorre com o passar do tempo da cultura *in vitro* (LEONE et al., 2016) sendo caracterizada pelos microrganismos endofíticos que aparecem no meio de cultura em razão de alterações ambientais e estresses físicos, químicos ou mecânicos (ESPOSITO-POLESI, 2015).

A classificação dos microrganismos em epifíticos e endofíticos depende da sua localização na planta, sendo que os organismos são classificados como endofíticos quando habitam o interior dos tecidos, seja em todo seu ciclo de vida ou em uma parte dele, e epifíticos quando localizam-se na superfície da planta. (AZEVEDO et al., 2000; LACAVA et al., 2006). Os organismos endofíticos podem

tornar-se patogênicos aos hospedeiros em condições de desequilíbrio (SILVA, 2006) mas, em condições ideais, muitos organismos são benéficos para as plantas, influenciando a aquisição de nutrientes, indução de resistência sistêmica e atividade supressiva contra organismos causadores de doenças (ANDREOTE et al., 2010).

Muitos trabalhos estão sendo desenvolvidos buscando identificar os microrganismos endofíticos *in vitro* e entender a interação entre planta e endófito como nos trabalhos com batata (*Solanum tuberosum*) (ANDREOTE et al., 2010), eucalipto (*Eucalyptus benthamii*) (ESPOSITO-POLESI et al., 2015) e abacaxi (*Ananas comusus*) (TARAZI, 2010; LEONE et al., 2016). Especificamente para o gênero *Ilex*, manifestações de bactérias endofíticas foram citadas na literatura para as espécies *Ilex paraguariensis* (LUNA et al., 2013) e *Ilex dumosa* (LUNA et al., 2008). Segundo os autores, tais manifestações, se não controladas, tornam inviável a utilização de biorreatores para micropropagação.

Plantas de abacaxi (*Ananas comusus*) micropropagadas a partir de meristemas e mantidas *in vitro* por cinco anos, tiveram suas raízes, folhas jovens e folhas maduras avaliadas com relação a presença de bactérias endofíticas. Neste estudo, os autores não só quebraram o paradigma de que culturas *in vitro* são “axênicas”, como também verificaram maior comunidade bacteriana em folhas jovens e maduras e menor nas raízes, fato este atribuído a diferença fisiológica de cada órgão (ABREU-TARAZI et al., 2010).

Estudos com plantas micropropagadas a partir de embriões excisados de sementes de pupunheira (*Bactris gasipaes*), apontaram a presença de bactérias endofíticas em plantas mantidas *in vitro*, sendo que a comunidade endofítica pode ser considerada importante para o desenvolvimento e metabolismo das plantas (ALMEIDA et al., 2009); enquanto que, para Pinus (*Pinus sylvestris*), a presença de bactérias endofíticas poderia ser uma das causas da baixa capacidade de regeneração de gemas *in vitro* (PIRTTILLA et al., 2000).

Estudos de introdução de explantes *in vitro*, coletados de ramos jovens da planta, foram realizados para amoreira (*Morus alba*); dos ramos, foram obtidos quatro tipos de explantes, segmentos da região inferior, mediana, superior e ápices caulinares. Os autores verificaram a não contaminação por organismos endofíticos em explantes do tipo ápices caulinares, seguido de uma contaminação endofítica crescente nos explantes do tipo segmentos nodais superiores, medianos e inferiores respectivamente (AROONPONG e CHANG, 2015).

2.7 METABOLOMA DE PLANTAS

O metabolismo primário das plantas compreende todos os processos que desempenham uma função essencial no vegetal como fotossíntese, respiração e transporte de solutos (PERES, 2004). Entre os metabólitos envolvidos no metabolismo primário encontram-se os açúcares e seus derivados, ácidos carboxílicos, lipídeos e aminoácidos. Esses compostos apresentam-se em concentrações variáveis nas células, são polares e são encontrados em qualquer célula viva (VILLAS-BÔAS e GOMBERT, 2006).

O metabolismo secundário origina compostos que não possuem uma distribuição universal, pois não são necessários para todas as plantas (FRAIGE, 2012), ou seja, estes metabólitos parecem não ter função direta no crescimento e desenvolvimento da planta, e são divididos em três grupos principais (terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados) (TAIZ e ZEIGER, 2009).

O metaboloma de plantas compreende a identificação e quantificação do conjunto de metabólitos sintetizados por um sistema biológico (FIEHN, 2001; KUSANO et al., 2007) sendo ainda um campo novo, mas de muita valia, já que é capaz de diferenciar genótipos e fenótipos baseados nos níveis de metabólitos presentes nos tecidos analisados (FRAIGE, 2012). Os metabólitos são intermediários de reações químicas e desempenham um papel importante na conexão das diversas rotas que operam um sistema vivo (VILLAS-BÔAS et al., 2005). Assim, o metaboloma pode servir para diferentes estudos, como análise de metabólitos em organismos geneticamente modificados e investigação de interações planta-patógeno, entre outros (FIEHN, 2002).

A interpretação da concentração de metabólitos é complexa; por exemplo, uma alta concentração de um composto pode significar um fluxo metabólico muito elevado, produção acelerada, degradação lenta, ou o conjunto de ambos. Assim um método para distinguir alguns modelos de fluxos metabólicos é analisar a correlação dos metabólitos, com isso, pode-se gerar hipóteses das vias metabólicas e regulação coordenada devido a algum mecanismo biológico (KUSANO et al., 2007).

2.8 REFERÊNCIAS

- ABREU-TARAZI, M. F.; NAVARRETE, A. A.; ANDREOTE, F. D.; ALMEIDA, C. V.; TSAI, S. M.; ALMEIDA, M. Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 555-560, 2010.
- ACQUADRO, A.; PAPANICE, M. A.; LANTERI, S.; BOTTALICO, G.; PORTIS, E.; CAMPANALE, A.; FINETTI-SIELER, M. M.; MASCIA, T.; SUMERANO, P.; GALLITELL, D. Production and fingerprinting of virus-free clones in a reflowering globe artichoke. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 100, p. 329-337, 2010.
- ALI, A. A.; ALQURAINY, F. Activities of antioxidants in plants under environmental stress. *In: The lutein – prevention and treatment for diseases*, India, Transworld Research Network, p. 187-256, 2006.
- AL-KHATEEB, A. A.; AL-KHATEEB, S. A. Effect of different combinations of growth hormones and its interaction on callogenesis. **Research Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 11, p. 83-88, 2015.
- ALMEIDA, C. V.; ANDREOTE, F. D.; YARA, R.; TANAKA, F. A. O.; AZEVEDO, J. L.; ALMEIDA, M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1757-1764, 2009.
- ANDRADE, W. F.; **Indução de rejuvenescimento de Teca (*Tectona grandis* L. f) através de enxertia seriada e micropropagação**. 76 f. Tese (Doutorado em ciências) – Departamento de Ciências Florestais, Universidade de São Paulo – Escola Superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.
- ANDREOTE, F. D.; ROCHA, U. N.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; OVERBEEK, L. S. V. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 97, p. 389-399, 2010.
- AROONPONG, P.; CHANG, J-C. Micropropagation of a difficult-to-root weeping mulberry (*Morus alba* var. Shidareguwa): A popular variety for ornamental purposes. **Scientia Horticulturae**, v. 194, p. 320-326, 2015.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 40 – 65, 2000.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul: Guia de Identificação e interesse ecológico**. 1 ed, p. 60-61, 2002.
- BARTON, M. K. Cell type specification and self renewal in the vegetative shoot apical meristem. **Plant Biology**, v. 1, p. 37-42, 1998.
- BERTOZZO, F.; MACHADO, I. S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 6, p. 1477-1482, 2010.

BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M.K. **Plant Tissue Culture: Theory and Practice**. Elsevier: Amsterdam. v. 5, p. 502, 1983.

BOLDUC, N.; HAKE, S. The Maize Transcription Factor KNOTTED1 Directly Regulates the Gibberellin Catabolism Gene *ga2ox1*. **The Plant Cell**, v. 21, p. 1647-1658, 2009.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq. v. 1, p. 87-132, 1998.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. il. color. (Coleção espécies arbóreas brasileiras, v. 1).

CASTELLANO, M. M.; SABLowski, R. Intercellular signalling in the transition from stem cells to organogenesis in meristems. **Plant Biology**, v. 8, p. 26-31, 2005.

CHATENET, M., DELAGE, C., RIPOLLES, M. Detection of sugarcane *yellow leaf virus* in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. **Plant Disease**, v. 85, n. 11, 2001.

CHA-UM, S.; HIEN, N. T. T.; KIRDMANEE, C. Disease-free production of sugarcane varieties (*Saccharum officinarum* L.) using in vitro meristem culture. **Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 443-448, 2006.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: CID, L. P. B. **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 51-66, 2010.

CONCI, V. V.; NOME, F. S. Virus free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. **Journal of Phytopathology**, v. 132, p. 186-192, 1991.

COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; MENDONÇA, A. B.; AMANCIO, V. F.; LEDO, A. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 068-072, 2007.

COSTA, C. M. C.; MAIA, L. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; NOGUEIRA, R. J. M. C. Influência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento de dois genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 6, p. 893-901, 2001.

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. Efeito da interação entre carvão ativado e N⁶- Benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, CV. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.

DANG, J. C.; KUMARIA, S.; KUMAR, S.; TANDON, P. Micropropagation of *Ilex*

khasiana, a critically endangered and endemic holly of Northeast India. **AoB Plants**, v.1, p. 1-6, 2011.

DARTORA, N. **Avaliação dos polissacarídeos e metabólitos secundários das folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em diferentes estados fisiológicos e de processamento**. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

DEBAT, H. J.; GRABIELE, M.; AGUILERA, P. M.; BUBILLO, R.; ZAPATA, P. D.; MARTI, D.A.; DUCASSE, D. A. The complete genome of a putative endornavirus identified in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Virus Genes**, v. 49, n. 2, p. 348-350, 2014.

DUNN, W. B., ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285-294, 2005.

DUTRA, L. F.; SILVA, N. D. G. **Estabelecimento *in vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St-Hil)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 7 p. (Embrapa Clima temperado. Comunicado técnico, 2009).

EDWIN, G.; REITZ, P. R. **Aquifoliáceas**. In: Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí, SC. P. 27-34. 1967.

EMAM, M.; ASSAREH, M. H. Micropropagation of *Eucalyptus globulus* through mature trees. **Journal of Genetic Resources**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2015.

ERIG, A C.; FORTES, G. R. Estabelecimento de pereira (*Pyrus* spp.) *in vitro* a partir de meristemas e gemas. **Revista Ciência Rural**, v. 32, p. 577-582, 2002.

ESPOSITO-POLESI, N. P. **Estudo da comunidade bacteriana endofítica e de sua manifestação na micropropagação de *Eucalyptus benthamii***. 152 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2015.

ESPOSITO-POLESI, N. P.; ANDRADE, P. A. M.; ALMEIDA, C. V.; ANDREOTE, F. D.; ALMEIDA, M. Endophytic bacterial communities associated with two explant sources of *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 31, p. 1737-1746, 2015.

FRAIGE, K. **Estudo comparativo do perfil metabolômico e proteômico de uvas (*Vitis vinifera*) durante o processo de maturação utilizando ferramentas bioanalíticas**. 227 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comparative and Functional Genomics**, v. 2, p. 155-168, 2001A.

FIEHN, O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 155-171, 2002B.

FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A. Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação da erva-mate. Brasília: EMBRAPA, 2000, p. 1-5. (Comunicado Técnico, 45).

FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Variação do desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate. **Pesquisa Florestal Brasileira**. Colombo, n. 54, p. 105-108, 2007.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p.151-158, 1968.

GATAMBIA, E. K.; KIHURANI, A. W.; RIMBERIA, F. K.; WAIGANJO, M. M. *In vitro* meristem culture for rapid regeneration of papaya plantlets in liquid media. **Annual Research & Review in Biology**. v. 9, n. 1, p. 1-7, 2016.

GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure – background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008.

GIBERTI, G. C. Aspectos oscuros de la corologia de *Ilex paraguariensis* St. Hil. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. de A.; TARASCONI, L. C. org. Erva-mate: Biologia e cultura no Cone Sul. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, p. 289-300. 1995.

GNOATTO, S. C. B.; SCHENKEL, E. P.; BASSANI, V. L. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 723-726, 2005.

GRIEBELER, A. G.; CONSATTI, G.; FREITAS, E. M.; SPEROTTO, R. A. Optimal culture conditions for the initial development of *Ilex paraguariensis* A. St-Hil. explants. **Acta Botanica Brasilica**, v. 28, n. 4. p. 548-551. 2014.

GROUT, B. W. W. Meristem-Tip Culture for Propagation and Vírus elimination. In: WALKER, J. M. **Plant Cell Culture Protocols**. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. 1999, p. 115-126.

GRUM, M.; CAMLOH, M.; RUDOLPH, K.; RAVNIKAR, M. Elimination of bean seed-borne bacteria by thermotherapy and meristem culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 52, p. 79-82, 1998.

GURI, D. J.; PATEL, K. N. **Compositions and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media**. United States Patent. US 5750402-A, 12 maio 1998.

HORBACH, M. A. **Propagação *in vitro* e *ex vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire – Aquifoliaceae)**. 63 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

HORBACH, M. A.; BISOGNIN, D. A.; KIELSE P.; QUADROS, K. M.; FICK, T. A. Micropropagação de plântulas de erva-mate obtidas de embriões zigóticos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 113-119, 2011.

HÖRNER, L. DE. A.; AUGUSTIN, L.; FORCELINI, C. A.; MIELKE, M. S.; SUZIN, M.; DENARDIN, N. D. Micropropagação de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 7, n. 1, p. 87-96, 2001.

HSU, Y. H.; ANNAMALAI, P.; LIN, C. S.; CHEN, Y. Y.; CHANG, W. C.; LIN, N. S. A sensitive method for detecting bamboo mosaic virus (BaMV) and establishment of BaMV-free meristem-tip cultures. **Plant Pathology**, v. 49, p. 101-107, 2000.

HSU, Y. H.; ANNAMALAI, P.; LIN, C. S.; CHEN, Y. Y.; CHANG, W. C.; LIN, N. S. AASIM, M.; KHAWAR, K. M.; OZCAN, S. *In vitro* micropropagation from shoot meristems of turkish cowpea (*Vigna unguiculata* L.) cv. Akkiz. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 37, n. 2, p. 149-154, 2008.

HU, C. Y. Holly (*Ilex* spp.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. v. 5, p. 412 – 487, 1989.

HU, C. Y. In vitro culture of rudimentar embryos of eleven *Ilex* speies. **Journal of the American Society of Horticultural Science**. v.100, n. 3, p. 221-225. 1975.

HU, C. Y. Light-mediated inhibition of in vitro development of rudimentary embryos of *Ilex opaca*. **American Journal of Botany**, v. 63, p. 651-656, 1976.

KARIYANA, N.; KARIYANA, K. Effect of ascorbic acid, activated charcoal and light duration on shoot regeneration of banana cultivar Barangan (*Musa acuminata* L.) in vitro culture. **IJRRAS**, v. 15, n. 1, p. 13-17, 2013.

KHANDEL, A. K.; KHAN, S.; GANGULY, S.; BAJAJ, A. *In vitro* shoot initiation from apical shoot buds e meristems of *Gloriosa superba* L. – An endangered medicinal herb of high commercial value. **Researcher**, v. 3, n. 11, p. 36-45, 2011.

KUMAR, S.; KHAN, M. S.; RAJ, S. K.; SHARMA, A. K. Elimination of mixed infection of *Cucumber mosaic* and *Tomato aspermy* virus from *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Pooja by shoot meristem culture. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 108-112, 2009.

KUMAR, O. A.; RAMESH, S.; TATA, S. S. Establishment of a rapid plant regeneration system in *Physalis angulate* L. through axillary meristems. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 7, n. 4, p. 471-474, 2015.

KUSANO, M.; FUKUSHIMA, A.; ARITA, M.; JONSSON, P.; MORITZ, T.; KOBAYASHI, M.; HAYASHI, N.; TOGHE, T.; SAITO, K. Unbiased characterization of genotype-dependent metabolic regulations by metabolomic approach in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Systems Biology**, v. 53, p. 53, 2007.

LACAVA, P. T.; ANDREOTE, F. D.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J. L. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 4, p. 637-642, 2006.

LEONE, G. F.; ALMEIDA, C. V.; ABREU-TARAZI, M.; BATAGIN-PIOTTO, K. D.; ARTIOLI-COELHO, F. A.; ALMEIDA, M. Antibioticoterapia em microplantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus*). **Ciência Rural**, v. 46, n. 1, p. 89-94, 2016.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v. 30, p. 421-327, 1980.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, v. 1, 4 ed. p. 368, 2002.

LUNA, C.; SANSBERRO, P. A.; MROGINSKI, L. A.; TARRAGÓ, J. Micropropagation of *Ilex dumosa* (aquifoliaceae) from nodal segments in a tissue culture system. **Biocell**, v. 27, n. 2, p. 205-212, 2003.

LUNA, C.; COLLAVINO, M.; MROGINSKI, L.; SANSBERRO, P. Identification and control of bacterial contaminants from *Ilex dumosa* nodal segments culture in a temporal immersion bioreactor system using 16 S rDNA analysis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 95, p. 13-19, 2008.

LUNA, C.; ACEVEDO, R.; GONZÁLEZ, A.; COLLAVINO, M.; MROGINSKI, L.; SANSBERRO, P. Endopytic bacteria from *Ilex paraguariensis* shoot cultures: localization, characterization, and response to isothiazolone biocides. **In vitro cellular & Developmental Biology Plant**, v. 49, n. 326-332, 2013.

MADHUSUDHANAN, K.; RAHIMAN, B. A. The effect of activated charcoal supplemented media to browning of in vitro cultures of *Piper* species. **Biologia Plantarum**, v. 43, n. 2, p. 297-299, 2000.

MAJADA, P. J.; TAMÉS, S. R.; REVILLA, A. M.; CASARES, A. Micropropagation of *Ilex aquifolium* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 36, p. 521-526, 2000.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração in vitro de louro pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Staudel). **Ciência Florestal**, v. 11, n. 2, p. 93-101, 2001.

MARTÍNEZ-VILLEGAS, Y. M.; ANDRADE-RODRÍGUEZ, M.; COLINAS-LEÓN, T.; VILLEGAS-TORRES, O. G.; CASTILLO-GUTIÉRREZ, A.; ALIA-TEJACAL, I. Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuíta (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 38, n. 4, p. 369-374, 2015.

MEENA, R. K.; GOUR, K.; PATNI, V. Production of leaf curl virus – free chilli by meristem tip culture. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 25, n. 2, p. 67-71, 2014.

MENDONÇA, D.; LUNA, S.; BETTENCOURT, S.; LOPES, M. S.; MONTEIRO, L.; NEVES, J. D.; MONJARDINO, P.; MACHADO, A. C. *In vitro* propagation of *Picconia azorica* (Tutin) Knobl. (Oleaceae) an Azorean endangered endemic plant species. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, p. 47, 2015.

MEZIANI, R.; JAITI, F.; MAZRI, M. A.; ANJARNE, M.; CHITT, M. A.; FADIGE, J. E.; ALEM, C. Effects of plant growth regulators and light intensity on the

micropropagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Mejhoul. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 325-331, 2015.

MOGHADAM, E. G.; ZAMANIPOUR, M. Initiation phase of meristem culture of *Prunus avium* cvs. "Hajyusefi" and "Zard". **International Journal of Biosciences**, v. 6, n. 2, p. 283-290, 2015.

MROGINSKI, L. A.; SANSBERRO, P. A.; SCOCCHI, A. M.; LUNA, C.; REY, H. Y. A cryopreservation protocol for immature zygotic embryos of species of *Ilex* (Aquifoliaceae). **Biocell**, v. 31, n. 1, p. 33-39, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** v. 15, p. 473-497, 1962.

NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. DA F.; CASTRO, G.Y. pH do meio de cultivo e crescimento de plântulas de ginseng brasileiro cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 2059-2062, 2008.

NIKLAS, C. O. Estudos embriológicos y citologicos em la yerba mate *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Bonplandia**, v.1, n.6, p.45-56, 1987.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate. In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS: SILVICULTURA DA ERVA-MATE, 10, 1983, Curitiba, **Anais...**Curitiba: URRPFCs, 1983. p. 17-35. (EMBRAPA- URRPFCs. Documentos, 25).

PAN, M. J.; STADEN, V. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. **Plant Growth Regulation**, v. 26, p. 155–163, 1998.

PARRDAZ, J. E.; OJAGH, S.; KAZEMNIA, H. D.; Effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) on meristem establishment and *in vitro* organogenesis of Iranian pear (*Pyrus glabra*). **International Journal of Agriculture and Biosciences**, v. 4, n. 5, p. 206-208, 2015.

PAUTLER, M.; TANAKA, W.; HINARO, H. Y.; JACKSON, D. Grass Meristems I: Shoot Apical Meristem Maintenance, Axillary Meristem Determinacy and the Floral Transition. **Plant Cell Physiology**, v. 54, n. 3, p. 302–312, 2013.

PEREIRA, G. A.; SANTAELLA, M. B.; ALVES, L. M. S.; SILVA, E. C. Desinfestação *in vitro* de bananeira 'farta velhaco' (subgrupo AAB) em diferentes concentrações de cloro ativo. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 4, p. 64-69, 2015.

PERES, L. P. P. **Metabolismo secundário**. Piracicaba: ESALQ, 2004. 25 p. (Apostila).

PIATCZAK, E.; TALAR, A.; KUZMA, L.; WYSOKINSKA, H. Iridoid and phenylethanoid glycoside production in multiple shoots and regenerated *Rehmannia elata* N.E. Brown ex Prain plants following micropropagation. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, 255 p, 2015.

PIERIK, R. L. M. **In vitro culture of higher plants**. Kluwer Academic Publishers: Netherlands. p. 348. 1997.

PINHO, D. S.; REY, M. S.; VEEIRA, A.; DANIELOWSKI, R.; BRAGA, E. J. B.; PETERS, J. A. Regeneração in vitro de melão, cv. 'Gaúcho'. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1083-1089, 2010.

PIRTTILA, A. M.; LAUKKANEN, H.; POSPIECH, H.; MYLLYLA, R.; HOHTOLA. Detection of intracellular bacteria in the buds of scotch Pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 3073-3077, 2000.

PREHN, D.; SERRANO, C.; MERCADO, A.; STANGE, C.; BARRALES, L.; ARCE-JOHNSON, P. Regeneration of whole plants from apical meristems of *Pinus radiata*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 91-94, 2003.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux. Contaminants of adaptes aux cultures in vitro de Prunus. **Acta Horticulturae**, v. 78, p. 437-442, 1977.

REY, H. Y.; BURTNIK, O. J.; SANSBERRO, P. A.; MROGINSKI, L. A.; Medios de cultivo para el establecimiento in vitro de explantos de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **Turrialba**, v. 41, n. 3, p. 306-310, 1991.

REY, H. Y.; SANSBERRO, P. A.; COLLAVINO, M. M.; DAVIÑA, J. R.; GOLZÁLEZ, A.M.; MROGINSKI, L. A. Colchicine, trifluralin, and oryzalin promoted development of somatic embryos in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Euphytica**, v. 123, p. 49-56, 2002.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F. Propagação da macieira cv gala através da cultura de meristemas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 4, n. 1, p. 39-43, 1992.

ROSSA, U. B. **Produtividade e compostos foliares de erva-mate sob efeitos de luminosidade e fertilização**. 2013, 208 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

RUGINI, E. In vitro propagation of some olive (*Olea europaea* L.) cultivars with different root ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. **Scientia Horticulturae**, v. 24, p. 123-134, 1984.

SAIDELLES, A. P. F.; KIRCHNER, R. M.; SANTOS, N, R. Z.; FLORES, É. M. M.; BARTZ, F. R. Análise de metais em amostras comerciais de erva-mate no sul do Brasil. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 259-265, 2010.

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A.; COLLAVINO, M. M. In vitro culture of rudimentary embryos os *Ilex paraguariensis*: responses to exogenous cytokinins. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 17, p. 101-105, 1998.

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A; COLLAVINO, M. M. In vitro plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 35, p. 401-4002, 1999.

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; BERNARDIS, A.; LUNA, C.; COLLAVINO, M. M.; MROGINSKI, L. A. Plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (aquifoliaceae) by in vitro culture of nodas segments. **Biocell**, v. 24, n.1, p. 53-63, 2000.

SANSBERRO, P. A.; LUIS, A.; MROGINSKI, L. A.; BOTTINI, R. In vitro morphogenetic responses of *Ilex paraguariensis* nodal segments treated with diferente gibberellins and prohexadione-Ca. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 209-214, 2001A.

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A. In vitro culture of zygotic embryos of *Ilex* species. **Hort Science**, v. 32, n. 2, p. 351-352, 2001B.

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A.; KRIVENKR, M. A. Plant regeneration from *Ilex* spp. (Aquifoliaceae) in vitro. **Biocell**, v. 25, n. 2, p. 139-146, 2001C.

SANTOS, D. C. DOS.; WENDLING, I. Avaliação de meios de cultura e métodos de desinfestação de explantes de plantas adultas de erva-mate. **Biofar**, v. 4, n. 2, p. 34-42, 2010.

SARTOR, F. R.; ZANOTTI, R. F.; PÔSSA, K. F.; PILON, A. M.; FUKUSHIMA, C. H. Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* de jacarandá da bahia. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 408-411, 2013.

SATISH, L.; CEASAR, S. A.; SHILPHA, J.; RENCY, A. S.; RATHINAPRIYA, P.; RAMESH, M. Direct plant regeneration from in vitro-derived shoot apical meristems of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.). **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 51, p. 192-200, 2015.

SHANI, E.; YANAI, O.; ORI, N. The role of hormones in shoot apical meristem function. **Plant Biology**, v. 9, p. 484-489, 2006.

SILVA, L. P.; ROGALSKI, M.; MORAES, L. K. A.; FESLIBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M. P. Estabelecimento e multiplicação in vitro de porta enxertos de *Prunus*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 297-300, 2003.

SILVA, M. E. **Comunidades fúngicas endofíticas, epifíticas e rizosférica em diferentes ecossistemas**. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociência, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SKIRVIN, R. M.; CHU, M. C.; MANN, M. L.; YOUNG, H.; SULLIVAN, J.; FERMANIAN, T. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. **Plant Cell Reports**, v. 5, p. 292-294, 1986.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. 2 ed. San Diego, CA: Academic Press, 2000.

SOUZA, A. P. R.; SILVA, S. R.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J. Antioxidantes e ausência de luz no desenvolvimento in vitro de *Schomburgkia crispa* Lindl. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 333-342, 2014.

SUN, Y.; ZHANG, D.; SMAGULA, J. Micropropagation of *Ilex glabra* (L.) A. Gray. **HortScience**, v. 45, n. 5, p. 805-808, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 722 p.

TARAZI, M. F. A. **Comunidade bacteriana endofítica em microplantas de abacaxizeiro: estrutura, diversidade e sua influência na sua morfofisiologia após antibioticoterapia**. 138 f. Tese (Doutorado em ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidas no Brasil**. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

VERMA, N.; RAM, R.; HALLAN, V.; KUMAR, K.; ZAIDI, A. A. Production of *Cucumber mosaic virus*-free chrysanthemums by meristem tip culture. **Crop Protection**, v. 23, p. 469-473, 2004.

VILLAS-BÔAS, S. G; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma. **Biotechnologia Ciência e desenvolvimento**, Ano IX, n. 36, p. 58-59, 2006.

VILLAS-BÔAS, S. G; MAS, S.; AKESSON, M. SMEDSGAARD, J. NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**. v. 24, pp. 613-646, 2005.

WHITE, P. R. Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. **American Journal of Botany**, v. 30, p. 33-36, 1943.

ZANIOLO, R. S.; ZANETTE, F. Micropropagação de erva-mate a partir de segmentos nodais. **Scientia Agraria**, v.2, n. 1, 2001.

ZANON, A. Produção de sementes de erva-mate. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1988. 7p. (EMBRAPA CNPQ. Circular técnica, 16).

ZHOU, BIN.; WEN, X.; WANG, R.; JIA, J. Quantification of the enzymatic browning and secondary metabolites in the callus culture system of *Nigella glandulifera* Freyn et Sint. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v. 5, n. 3, p. 109-116. 2010

3 CAPÍTULO 1

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE MERISTEMAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St – Hil) E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIA ENDOFÍTICA

RESUMO

A erva-mate é uma espécie nativa de grande importância econômica, social e ambiental para a região sul do Brasil. Atualmente, obtêm-se os mais diversos produtos das folhas do mate, dentre eles o chá mate. O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento *in vitro* de meristemas (com 2 a 4 primórdios foliares) de clones elite de erva-mate e identificação de bactéria endofítica isolada neste tipo de explante. Foram estudados os efeitos do clone (F1, F2, A03, A07), de meios de cultura (MS, 1/2MS, 1/4MS e WPM), de citocininas (cinetina, BAP e 2iP), de diferentes concentrações de carvão ativado (1, 2 e 3 g.L⁻¹) e de agentes desinfestantes (hipoclorito de sódio e cloreto de mercúrio) no estabelecimento *in vitro*. Como resultados, aponta-se ser os clones F1 e F2 os mais responsivos em cultura de meristemas quando cultivados em meio WPM com 0,1 µM de ANA e 2,2 µM de BAP. Porém, para o clone F1, o meio de cultura WPM adicionado de 8,8 µM de 2iP, 0,2 µM de ANA e 3 g.L⁻¹ de carvão ativado foi o mais indicado para o estabelecimento *in vitro*. Não foi observado efeito fitotóxico significativo dos agentes desinfestantes testados. A bactéria endofítica isolada neste trabalho foi identificada como sendo *Agrobacterium larrymoorei*. Em conclusão, foi possível o estabelecimento *in vitro* de erva-mate a partir de meristemas, porém estes não são livres de microrganismos endofíticos, que podem interferir na resposta dos tecidos em cultura *in vitro*.

Palavras-Chave: cultura de tecidos, 2iP, carvão ativado, antioxidante, *Agrobacterium larrymoorei*.

Fomento: Universidade Federal do Paraná; CAPES; Embrapa Florestas.

3 CHAPTER 1

***IN VITRO* ESTABLISHMENT OF YERBA MATE SHOOT MERISTEMS (*Ilex paraguariensis* A. St-Hil) AND IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA**

ABSTRACT

The yerba mate is a native species of great economic, social and environmental importance for the southern region of Brazil. Currently, the most diverse products are obtained from mate leaves, including the mate tea. The objective of this study was to establish shoot meristem culture (with 2 to 4 leaf primordia) of yerba mate elite clones and identify the endophytic bacteria present in the explant. We tested the

effect of clone (F1, F2, A03 and A07), culture medium (MS, 1/2MS, 1/4MS and WPM), cytokinin (kinetin, BAP and 2iP), activated charcoal at concentrations of 1, 2 and 3 g.L⁻¹ and disinfectant (sodium hypochlorite and mercuric chloride) for *in vitro* establishment. F1 and F2 clones were the most responsive for shoot meristem culture when cultured in WPM medium with 0,1 uM NAA and 2,2 uM BAP. However, for F1 clone, medium WPM supplemented with 8.8 uM 2iP, 0.2 uM NAA and 3 g.L⁻¹ activated charcoal was the most suitable for the *in vitro* establishment. No phytotoxic effect of the disinfectant was observed. The isolated endophytic bacterium was identified as *Agrobacterium larrymoorei*. In conclusion it is possible to establish yerba mate *in vitro* from shoot meristems, but these were not free of endophytic microorganisms, which in turn interfere in explant response.

Keywords: tissue culture, 2iP, activated charcoal, antioxidant, *Agrobacterium larrymoorei*.

Promotion: Federal University of Paraná; CAPES; Embrapa Forests.

3.1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma árvore nativa do Brasil, Argentina, Paraguai e pontos menos expressivos no Uruguai (OLIVEIRA e ROTTA, 1983). A espécie é cultivada em sistemas agroflorestais ou monocultivo (AZEVEDO et al., 2013) apresentando grande importância econômica, principalmente pela produção de bebidas estimulantes como o “mate” (SANSBERRO et al., 2001A). No ano de 2013, o Brasil produziu 515.451,00 toneladas de mate, sendo 68.721,00 toneladas destinadas à exportação para países como Alemanha, Austrália, Bolívia e outros. (FAO, 2013).

No cenário atual, a maioria dos ervais são nativos ou plantados a partir de sementes, ou seja, com material genético heterogêneo e muitas vezes de baixa produtividade. A nível de Brasil no ano de 2013, a extração de ervais nativos foi de 344.594,00 toneladas de erva-mate, sendo que o estado do Paraná participou com 74% desses resultados (DERAL, 2014).

Os problemas com os quais se depara o cultivo a partir de sementes de erva-mate, são decorrentes da dormência embrionária, do longo tempo destinado a estratificação (5 a 6 meses) e da germinação demorada, desuniforme e em baixo percentual (de 5 a 20%) (HU, 1975; ZANON, 1988). A propagação vegetativa por estaquia também apresenta limitações para adoção em escala comercial, principalmente relacionada a métodos eficientes de rejuvenescimento do material adulto (SANTOS e WENDLING, 2010). Assim, métodos de rejuvenescimento para

posterior estaquia vem sendo estudados para a espécie, como nos trabalhos de BITENCOURT et al. (2009) e WENDLING et al. (2013). Frente a esta problemática, a micropropagação é uma alternativa, pois, além de possibilitar a obtenção de um grande número de plantas por meio da multiplicação, possibilita a manutenção das bases genéticas do material vegetal selecionado em programas de melhoramento genético (SILVA et al., 2003; BERTOZZO e MACHADO, 2010).

A maioria dos trabalhos realizados *in vitro* para erva-mate utilizam material vegetal juvenil e não selecionado (DUTRA e SILVA, 2009) e tem como fonte de explantes principalmente segmentos nodais (SANSBERRO et al., 1999; SANSBERRO et al., 2000; HÖRNER et al., 2001; SANSBERRO et al., 2001A; ZANIOLO e ZANETTE 2001; GRIEBELER et al., 2014). A maior dificuldade de estabelecimento a partir de segmentos nodais da espécie é a grande taxa de contaminação e oxidação inicial dos tecidos (HORBACH, 2008), além do aparecimento de bactérias endofíticas (LUNA et al., 2008), as quais, segundo os autores, inviabilizam a utilização de biorreatores caso não controladas.

A utilização de meristemas como fonte de explantes para início da cultura *in vitro* de erva-mate, foi pouco citada na literatura, sendo verificada a morte dos explantes ao fim de 60 dias de cultivo (SANSBERRO et al., 1999). A maior vantagem na utilização de meristemas, consiste na remoção de organismos patogênicos, principalmente vírus, que muitas vezes estão presentes na planta doadora (GROUT, 1999; GEORGE, 2008), porém, nem sempre os meristemas são axênicos, como verificado em abacaxi (*Ananas comosus*), onde bactérias endofíticas foram localizadas internamente aos tecidos em plantas obtidas a partir de meristemas, e mantidas *in vitro* por cinco anos (TARAZI, 2010).

Contudo, explantes menores reduzem a incidência de microrganismos nas culturas *in vitro*, como verificado em meristemas de pereira (*Pyrus spp*), quando comparado com gemas introduzidas *in vitro* (ERIG e FORTES, 2002); cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) com meristemas de 0,5 mm quando comparado com meristemas maiores (1 e 1,5 mm) (CHA-UM et al., 2006), assim como em ápices caulinares de amoreira (*Morus nigra*) quando comparado com segmentos nodais (AROONPONG e CHANG, 2015). Explantes menores também podem resultar no decréscimo da percentagem de oxidação, mas a resposta é ainda dependente do genótipo, como verificado no estudo com diferentes tamanhos de ápices caulinares de ficus (*Ficus carica*) cultivados *in vitro* (BAYOUDH et al., 2015).

Meristemas também são a principal fonte de explante para obtenção de plantas livre de vírus, sendo uma técnica utilizada para muitas espécies como alho (*Allium sativum*) (CONCI e NOME, 1991), cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) (CHATENET et al., 2001), bambu (*Bambusa oldhamii*) (HSU et al., 2000), crisântemo (*Chrysanthemum morifolium*) (VERMA et al., 2004; KUMAR et al., 2009), cardo (*Cynara cardunculus*) (ACQUADRO et al., 2010), pimentão (*Capsicum annuum*) (MEENA et al., 2014). A identificação de vírus em erva-mate foi relatada por DEBAT et al. (2014), sendo proposta a nomenclatura para o vírus de *Yerba mate endornavirus*. Assim, a cultura de meristemas de erva-mate representa uma ferramenta importante para obtenção de plantas livres de vírus, redução da incidência de microrganismos e redução das taxas de oxidações.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi o estabelecimento *in vitro* de meristemas de erva-mate de clones elite, visando a micropropagação da espécie, assim como identificação de bactéria endofítica presente nestes explantes.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local de pesquisa e coleta do material vegetal

Os experimentos foram realizados na EMBRAPA Florestas localizada no município de Colombo/Paraná-Brasil. Os clones comerciais denominados F1, F2, A03 e A07, são provenientes de um programa de melhoramento genético desenvolvido pela EMBRAPA Florestas, sendo estes selecionados por várias características silviculturais, tendo como ponto chave de seleção a maior produção de massa verde (RESENDE et al., 2000). O material vegetal dos clones A03 e A07 é procedente de árvores matrizes com 10 anos de idade localizadas no município de Ponta Grossa-PR; por sua vez, os clones F1 e F2 são procedentes de árvores matrizes com 80 anos de idade localizadas no município de São Mateus do Sul-PR.

As plantas utilizadas são mantidas em um minijardim clonal em sistema semi-hidropônico em canaletão com areia, alocado em casa de vegetação. A irrigação por gotejamento foi feita com solução nutritiva (WENDLING e DUTRA, 2008) duas vezes por dia na estação de inverno (2,5 L.m⁻² / aplicação) por um período de 4 min e 40 segundos; e três vezes por dia na estação de verão (1,7 L.m⁻² / aplicação) por um período de 3 min e 6 segundos. As coletas dos segmentos foram realizadas pelo

período da manhã e os segmentos foram acondicionados em recipiente contendo solução antioxidante de ácido ascórbico ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$) e ácido cítrico ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$) diluídos em água.

3.2.2 Desinfestação e tratamento dos segmentos nodais

No Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação, os segmentos nodais livres de folhas foram lavados com água e detergente neutro e enxaguados em água corrente; após, foram imersos em solução do fungicida sistêmico Cercobin ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$) por 10 min e novamente enxaguados em água corrente. Em câmara de fluxo laminar o material vegetal foi desinfestado com etanol (70%) por 1 min e hipoclorito de sódio (2,5%) por 10 min. Após triplo enxágue em água bidestilada autoclavada, foram imersos em solução de ácido cítrico (5 g.L^{-1}) para evitar a oxidação até o momento de extração dos meristemas. A solução antioxidante foi esterilizada por filtração, utilizando filtro descartável Millex – GP® com membrana estéril de $0,22 \mu\text{m}$.

3.2.3 Cultura de meristemas

3.2.3.1 Excisão dos meristemas

Os meristemas das gemas axilares presentes nos segmentos nodais, foram extraídos com primórdios foliares (entre 2 e 4 primórdios por explante) na capela de fluxo laminar com auxílio de estereomicroscópio, bisturi e pinças, e inoculados em frascos de vidro com 8 cm de altura por 3 cm de largura, contendo 10 mL de meio de cultura e vedados com plástico filme.

3.2.3.2 Meios e condições de cultura

Todos os meios de cultura utilizados neste trabalho tiveram como suplementos 30 g.L^{-1} de sacarose e 7 g.L^{-1} de ágar, sendo o pH ajustado em 5.8 antes da autoclavagem a 121°C por 20 min. O material inoculado permaneceu por 15 dias no escuro sendo posteriormente transferidos para luz. As culturas foram mantidas em fitotron sob luz branca fria, com fotoperíodo de 16 horas, fluxo de

fótons de $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de 27°C . As repicagens para meios frescos foram realizadas a cada 30 dias.

3.2.3.3 Efeito dos meios de cultura

Neste experimento foram testados 4 meios de cultura (Anexo 1) sendo WPM (LLOYD e McCOWN, 1980), MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e as variações de sais do meio MS: $\frac{1}{2}$ MS com a concentração de sais reduzida pela metade e $\frac{1}{4}$ MS com a concentração de sais reduzida quatro vezes (Anexo 1). As vitaminas e componentes orgânicos dos meios de cultura permaneceram iguais aos meios originais. Os quatro meios continham $0,1 \mu\text{M}$ de ANA e $2,2 \mu\text{M}$ de BAP. O material vegetal utilizado neste experimento foi uma mistura (em igual quantidade) dos clones elite F1, F2, A03 e A07. As avaliações foram feitas aos 30 e 60 dias, sendo observado coloração (explantes totalmente verdes, amarelados ou marrons (oxidados) e estado (explantes intumescidos ou estagnados).

3.2.3.4 Efeito do genótipo

Para avaliação do efeito do genótipo, foram utilizados quatro clones denominados F1, F2, A03 e A07. O meio de cultura utilizado foi WPM com $0,1 \mu\text{M}$ de ANA e $2,2 \mu\text{M}$ de BAP. As avaliações da coloração (explantes totalmente verdes ou marrons (oxidados)) foram realizadas aos 30 e 60 dias.

3.2.3.5 Efeito da concentração de carvão ativado

Neste experimento, utilizou-se o meio de cultura WPM, suplementado com $0,2 \mu\text{M}$ de ANA e $2,2 \mu\text{M}$ de BAP e meristemas do clone F1. Os tratamentos foram compostos por 3 concentrações de carvão ativado ($1, 2$ e 3 g.L^{-1}) e testemunha. As avaliações da coloração (explantes totalmente verdes ou marrons (oxidados)) foram realizadas aos 30 e 60 dias.

3.2.3.6 Efeito de citocininas associadas a auxina ANA

Foram utilizados explantes do clone F1, meio de cultura WPM, 3 g.L⁻¹ de carvão ativado e 0,2 µM de ANA. Os tratamentos consistiram de três citocininas sendo elas: cinetina, 2iP e BAP todas nas concentrações de 8,8 µM. As avaliações foram feitas aos 30 e 60 dias, sendo observado coloração (explantes totalmente verdes ou marrons (oxidados) e estado (explantes intumescidos, estagnados) ou com calos.

3.2.3.7 Efeito do agente desinfestante

Buscou-se elucidar se o hipoclorito de sódio utilizado na desinfestação estava causando toxidez aos tecidos, por meio dos seguintes tratamentos de desinfestação: cloreto de mercúrio (0,05%) por 10 min com e sem desinfestação superficial prévia com álcool (70%) por 1 min; hipoclorito de sódio (2,5%) por 10 min com e sem desinfestação superficial prévia com álcool 70% por 1 min. Foi utilizado material vegetal do clone F1, meio de cultura WPM suplementado com 3 g.L⁻¹ de carvão ativado, 8,8 µM de 2iP e 0,2 µM de ANA. Foram avaliados ao fim de 30 e 60 dias as variáveis coloração (explantes totalmente verdes, amarelados ou marrons (oxidados)) e estado (explantes intumescidos, estagnados), com calos ou brotados.

3.2.4 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 40 repetições por tratamento, sendo que cada repetição refere-se a um meristema.

As análises dos dados dos experimentos foram realizadas pelo teste do Escore Médio (Qs) (AGRESTI, 2002) a 5%. A comparação entre os tratamentos foi feita pelo mesmo teste, comparando-se sempre duas combinações de tratamentos por vez. Na significância do teste ($p < 0,05$), a seleção do melhor tratamento foi feita com base em um quadro de contagem dado em percentagem considerando $p < 0,05$, utilizando o programa estatístico R (R CORE TEAM, 2016).

3.2.5 Análise histológica

Para observação da diferenciação dos tecidos, foi realizada análise histológica de gemas do clone F1 no momento da coleta (testemunha) e do meristema brotado proveniente do experimento numerado 3.2.3.7 após 70 dias de cultura *in vitro*. O material vegetal foi fixado em FAA (70%) (proporção 1:1:18) (formaldeído 37%, ácido acético glacial e álcool etílico 70%) por 24 horas (JOHANSEN, 1940). Após, os explantes foram conservados em álcool etílico (70%). Para realização dos cortes histológicos, as amostras foram infiltradas e emblocadas em historesina Leica® de acordo com o protocolo do fabricante. Os blocos resultantes foram seccionados longitudinalmente a 5 µm de espessura, em micrótomo rotativo manual (Leica®) e os cortes foram corados com azul de toluidina (1%) por 10 min. As lâminas histológicas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus®) acoplado a câmera fotográfica para captura de imagens no Laboratório de Botânica Estrutural da UFPR.

3.2.6 Análise ultra estrutural

As amostras de meristemas introduzidas *in vitro* aos 30 dias, sem contaminação, foram fixadas conforme metodologia anterior e posteriormente desidratadas em gradiente de álcool (50, 70, 80, 90 e 100%) onde permaneceram por 10 minutos. Após a desidratação, os meristemas foram conduzidos ao aparelho de ponto crítico para a secagem e, então, montados em suportes para cobertura com ouro. As amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura LEO Evo 40 no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

3.2.7 Estudo de bactéria endofítica

3.2.7.1 Isolamento e identificação de bactéria endofítica

Para isolamento de bactéria endofítica, um meristema do clone F1 livre de contaminação aos 30 dias de cultura *in vitro*, foi repicado para meio LB sólido (SAMBROOK et al., 1989) (Anexo 3) contendo 10 g L⁻¹ de NaCl, 10 g L⁻¹ triptona e 5 g L⁻¹ de extrato de levedura, em pH 7.0. O material foi inoculado em fitrotron (nas

mesmas condições da cultura de meristemas). Após 3 dias, as bactérias que cresceram em torno do explante foram transferidas para meio LB sólido durante mais 3 dias nas mesmas condições para obtenção de colônias puras. Após, as colônias foram individualizadas para extração do DNA e sequenciamento.

A identificação do isolado obtido do meristema do clone F1 foi realizada por meio do sequenciamento da região 16S do gene rRNA. A extração do DNA genômico total foi realizada segundo descrito por VICENTE et al. (2008) utilizando sílica:celite (2:1) para maceração em CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) e purificação com clorofórmio. Após a precipitação, o DNA foi quantificado utilizando NanoDrop 1000 (Espectrofotômetro Thermo Scientific) e gel de agarose (1%). Para análise de sequenciamento da região 16S do gene rRNA, foram utilizados os primers Y1f (sentido 5'-3') na posição 20-43 (TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC) e Y3r (sentido 3'-5') na posição 1482-1507 (TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC). Para a reação de PCR foi utilizada uma mistura de 25 µL contendo: 1,0 U de Taq DNA polimerase, 2,0 mM MgCl₂, 1x PCR tampão, 2,0 mM de cada dNTP, 0,4 mM de cada primer Y1f (sentido 5'-3') e Y3r (sentido 3'-5') (Invitrogen, Brasil) e aproximadamente 50 ng de DNA. A reação foi processada em termociclador com ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 min; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto; anelamento a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 min; com ciclo de extensão final de 72°C por 6 min. A amplificação foi observada por eletroforese em gel de agarose 1%.

O produto da PCR foi purificado utilizando PEG segundo a seguinte metodologia: 50 µL de PEG 20% foi pipetado nos tubos contendo o produto da PCR, sendo misturado delicadamente com a pipeta, após foi mantido a 37°C por 30 min. Findada esta etapa o produto foi centrifugado por 20 min a 13000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Na sequência foi adicionado 125 µL de etanol resfriado 80% ao "pellet" que foi novamente centrifugado por 2 min e o sobrenadante descartado. Este passo foi repetido com etanol 96% (-20°C), e então o "pellet" foi seco a 45°C por 1 hora. Por fim, o "pellet" foi resuspendido com 15 µL de água milliQ e deixado a temperatura ambiente por 2 horas. O sequenciamento foi realizado com os mesmos primers Y1f e Y3r, os produtos da primeira PCR já purificados receberam 1 µL de mix para sequenciamento *Big Dye*; 2 µL de tampão de sequenciamento; 0,5 µL do *primer* a 1,5 pmol; 3 µL da PCR purificada e 3,5 µL de água ultrapura. O procedimento foi realizado separadamente para cada *primer*

utilizado. O sequenciamento foi realizado no laboratório de microbiologia LABmicro/UFPR (<http://people.ufpr.br/~labmicro/>) utilizando o sequenciador Applied Biosystems modelo 3130.

3.2.7.2 Alinhamento e construção filogenética

A edição das sequências foi realizada utilizando o programa Staden versão 1.6 (BONFIELD et al., 2002). As sequências foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados de referência NCBI (National Center for Biotechnology Information - <Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pelo programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) para determinar a semelhança entre as sequências. Para o alinhamento das sequências, foi utilizado o programa Mafft (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) e as sequências inspecionadas visualmente pelo programa MEGA version 5.1 (TAMURA et al., 2011). Para análise filogenética foram utilizadas como referência 14 linhagens tipos do gênero *Agrobacterium* (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2015), tendo como grupo externo *Bradyrhizobium japonicum* USDA 136 (BOUZAR et al., 1995). A árvore filogenética foi construída baseada em Maximum Likelihood utilizando análise de bootstrap de 1000 repetições, usando o modelo evolutivo Kimura 2 Parâmetros com o programa MEGA versão 5.1 para edição final (TAMURA et al., 2011).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Estabelecimento *in vitro* de meristemas de erva-mate

3.3.1.1 Efeito do meio de cultura

No estudo do efeito do meio de cultura, houve diferença estatística entre os resultados de coloração (explantes verdes, amarelos ou marrons (oxidados)) aos 30 dias *in vitro* [Qs=27,08 (p<0,001)], sendo também significativa aos 60 dias [Qs=30,45 (p<0,001)]. Já para a variável estado do meristema (explantes intumescidos ou estagnados) aos 30 dias não foi observada diferença entre os tratamentos, porém aos 60 dias, houve diferença entre os meios de cultura para esta variável [Qs=13,85 (p<0,003)].

Para a variável coloração, o meio WPM mostrou-se superior aos 30 dias de cultura *in vitro*, pois apresentou maior percentagem de explantes verdes; aos 60 dias esse meio permaneceu superior, porém sem diferença estatística com os resultados obtidos no meio $\frac{1}{2}$ MS (Tabela 1 e 2). Quanto aos demais meios notou-se uma inversão ao longo do tempo, sendo que aos 30 dias *in vitro* o meio mais diluído ($\frac{1}{4}$ MS) apresentou maior manutenção de explantes verdes que o meio $\frac{1}{2}$ MS, porém aos 60 dias o meio mais concentrado ($\frac{1}{2}$ MS) foi mais eficiente. O padrão de inversão ocorreu também quando foram comparados os meios $\frac{1}{4}$ MS vs MS e $\frac{1}{2}$ MS vs MS ao longo do tempo. Cabe salientar que, aos 60 dias, a maior percentagem de explantes marrons (oxidados) foi observada no meio mais diluído ($\frac{1}{4}$ MS) (Tabela 2).

Para a variável estado, houve diferença estatística somente aos 60 dias *in vitro* (Tabela 1). O meio WPM foi superior com relação aos demais, uma vez que este foi o único que proporcionou resultados estatisticamente significativos quando comparado com os outros. Para esta variável, no meio WPM obteve-se 61,8% de explantes intumescidos (Tabela 2), ou seja, que reagiram a composição salina e orgânica e demonstraram sinais de desenvolvimento *in vitro*.

TABELA 1 – SIGNIFICÂNCIA DO TESTE ESCORE MÉDIO (QS) PARA AS VARIÁVEIS CATEGÓRICAS COLORAÇÃO E ESTADO ENTRE OS TRATAMENTOS

Comparação entre os tratamentos	Significância do teste para as variáveis		
	30 dias <i>in vitro</i>	60 dias <i>in vitro</i>	
	Coloração	Coloração	Estado
$\frac{1}{4}$ MS vs $\frac{1}{2}$ MS	Qs=10,52***	Qs=23,55***	Qs=0,802 ^{ns}
$\frac{1}{4}$ MS vs MS	Qs=4,92*	Qs=40,12***	Qs=0,442 ^{ns}
$\frac{1}{4}$ MS vs WPM	Qs=12,94***	Qs=23,94***	Qs=11,19***
$\frac{1}{2}$ MS vs MS	Qs=12,93***	Qs=23,98***	Qs=0,055 ^{ns}
$\frac{1}{2}$ MS vs WPM	Qs=22,99***	Qs=3,43 ^{ns}	Qs=6,33*
MS vs WPM	Qs=6,07*	Qs=11,63*	Qs=7,503*

Sendo: A comparação entre os tratamentos é significativa quando p for menor ou igual a 0,05; ^{ns}: nível descritivo de probabilidade não significativo a 5%; * Significativo a 5% de probabilidade;

***Significativo a 0,1% de probabilidade.

TABELA 2 – COLORAÇÃO (VERDE, AMARELO E MARROM) E ESTADO (ESTAGNADO E INTUMESCIDO) DE MERISTEMAS DE ERVA-MATE APÓS 30 E 60 DIAS DE CULTURA EM DIFERENTES MEIOS COM 0,1 µM de ANA e 2,2 µM de BAP

Meio de cultura	Coloração (%)			Estado (%)	
	Verde	Amarelo	Marrom*	Estagnado	Intumescido
30 dias					
¼ MS	60,0	25,0	15,0	80,0	20,0
½ MS	43,8	29,3	26,9	65,8	34,2
MS	73,2	22,0	4,8	68,3	31,7
WPM	92,8	7,2	0,0	66,7	33,3
60 dias					
¼ MS	22,4	7,6	70,0	75,0	25,0
½ MS	43,9	29,3	26,8	65,8	34,2
MS	14,6	70,7	14,7	68,3	31,7
WPM	54,7	38,1	7,2	38,2	61,8

* Coloração referente aos meristemas oxidados.

3.3.1.2 Efeito do genótipo

No estudo do efeito do genótipo *in vitro*, observou-se diferença entre os tratamentos para variável coloração (explantes verdes ou marrons (oxidados)) aos 30 dias [Qs=9,089 (p<0,001)], assim como aos 60 dias *in vitro* [Qs=9,089 (p<0,001)]. Aos 30 e 60 dias de cultura, os clones F1 e F2 não diferiram entre si, já os clones A03 e A07 não diferiram aos 30 dias, mas diferiram aos 60 dias de cultura *in vitro*. As demais comparações entre os clones diferiram entre si aos 30 e 60 dias *in vitro* (Tabela 3). Os clones F1 e F2 foram os clones mais responsivos *in vitro*, pois apresentaram maior percentagem de explantes verdes quando comparados com todos os outros, enquanto que o clone A03 foi o que apresentou maior percentagem de explantes marrons (oxidados), seguido do clone A07 (Tabela 4). Assim, o clone F1 foi o genótipo selecionado para todos os outros experimentos *in vitro*.

TABELA 3 - SIGNIFICÂNCIA DO TESTE ESCORE MÉDIO (QS) PARA A VARIÁVEL CATEGÓRICA COLORAÇÃO VERDE OU MARRON (OXIDADO) DOS MERISTEMAS ENTRE OS CLONES F1, F2, A03 E A07

Comparação entre os clones	Coloração (meristemas verdes ou marrons*)	
	30 dias <i>in vitro</i>	60 dias <i>in vitro</i>
F1 vs F2	Qs= 0,24ns	Qs= 0,42ns
F1 vs A03	Qs= 5,05*	Qs= 5,75*
F1 vs A07	Qs= 3,70*	Qs= 31,0*
F2 vs A03	Qs= 7,24*	Qs= 20,14*
F2 vs A07	Qs= 5,64*	Qs= 16,66*
A03 vs A07	Qs= 0,10ns	Qs= 14,62*

Sendo: ^{ns} nível descritivo de probabilidade não significativo a 5%; * Significativo a 5% de probabilidade; ***Significativo a 0,1% de probabilidade.

TABELA 4 - COLORAÇÃO VERDE OU MARRON (OXIDADO) DE MERISTEMAS DE ERVA-MATE PARA OS CLONES F1, F2, A03 e A07 AOS 30 e 60 DIAS DE CULTURA EM MEIO DE CULTURA WPM COM 0,1 μ M DE ANA E 2,2 μ M DE BAP

Clones	Meristemas verdes %	Meristemas marrons* %
	30 dias <i>in vitro</i>	
F1	61,53	38,47
F2	62,16	37,84
A03	30,76	68,24
A07	34,21	65,79
Clones	60 dias <i>in vitro</i>	
F1	56,41	43,59
F2	62,16	37,84
A03	12,82	87,18
A07	34,21	65,79

*coloração referente aos meristemas oxidados

3.3.1.3 Efeito da concentração de carvão ativado

No estudo do efeito da concentração de carvão ativado, houve diferença estatística para variável coloração (explantes verdes ou marrons (oxidados)) entre os tratamentos aos 60 dias *in vitro* [$Q_s=52,68$ ($p<0,001$)]. Verificou-se que não houve diferença estatística apenas na comparação da concentração de 1 vs 2 g.L⁻¹ de carvão ativado, enquanto que, para todas as outras combinações houve diferença (Tabela 5). Na testemunha, ao fim de 60 dias de cultivo *in vitro*, houve 100% de explantes marrons (oxidados), ao passo que, na concentração de 3 g.L⁻¹ de carvão, obteve-se 80,12% de explantes verdes (Tabela 6). Assim, 3 g.L⁻¹ de carvão ativado foi a concentração mais indicada para o controle da oxidação *in vitro* do clone F1, uma vez que foi superior às demais concentrações (0,1, 2 g.L⁻¹) (Tabela 5 e 6).

TABELA 5 - SIGNIFICÂNCIA DO TESTE ESCORE MÉDIO (QS) PARA A VARIÁVEL CATEGÓRICA COLORAÇÃO (VERDE OU MARRON (OXIDADO)) DOS MERISTEMAS ENTRE OS TRATAMENTOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARVÃO ATIVADO

Comparação entre os tratamentos (g.L ⁻¹)	Significância do teste para coloração aos 60 dias <i>in vitro</i>
0 vc 1	$Q_s=6,2^{***}$
0 vs 2	$Q_s=5,8^{***}$
0 vs 3	$Q_s=31,0^{***}$
1 vs 2	$Q_s=0,0^{ns}$
1 vs 3	$Q_s=15,7^{***}$
2 vs 3	$Q_s=14,6^{***}$

Sendo: A comparação entre os tratamentos é significativa quando p for menor ou igual a 0,05; ^{ns}: nível descritivo de probabilidade não significativo a 5%; ^{***}Significativo a 0,1% de probabilidade.

TABELA 6 - COLORAÇÃO VERDE OU MARRON (OXIDADO) DE MERISTEMAS DE ERVA-MATE AOS 60 DIAS DE CULTURA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARVÃO ATIVADO ADICIONADO AO MEIO DE CULTURA WPM COM 0,2 μ M DE ANA E 2,2 μ M DE BAP PARA O CLONE F1

Concentrações de carvão ativado (g.L ⁻¹)	Meristemas verdes %	Meristemas marrons* %
0	0	100
1	50	50
2	50	50
3	80,12	19,88

*coloração referente aos meristemas oxidados

3.3.1.4 Efeito de citocinina associada a auxina ANA

Houve diferença estatística aos 30 dias de cultura *in vitro* [Qs=11,18 (p<0,025)] sendo também significativa aos 60 dias [Qs=14,09 (p=0,007)] para a variável estado (explantes intumescidos, estagnados, ou com formação de calos). Diferença estatística também foi observada aos 30 dias de cultivo [Qs=10,92 (p<0,028)] e 60 dias [Qs=22,93 (p<0,001)] para as variáveis coloração (explantes totalmente verdes ou marrons (oxidados)).

Observou-se que, para variável coloração (explantes totalmente verdes ou marrons (oxidados)) aos 30 dias *in vitro*, houve diferença estatística somente entre os tratamentos com 2iP comparado com cinetina ou testemunha (2iP vs Cinetina, Qs=10,5118 (p=0,001); 2iP vs testemunha Qs=5,250 (p=0,022); já aos 60 dias *in vitro* houve diferença estatística entre os tratamentos com 2iP comparado com cinetina, BAP e testemunha (2iP vs Cinetina, Qs=14,787 (p=0,001); 2iP vs BAP, Qs=13,54 (p<0,001) e 2iP vs testemunha, Qs=11,907 (p=0,022) (Anexo 4).

Para variável estado (explantes intumescidos, estagnados, ou com formação de calos) aos 30 dias de cultivo *in vitro*, diferença estatística foi observada entre os tratamentos com 2iP comparado com cinetina e testemunha e com cinetina comparada com BAP (2iP vs Cinetina, Qs=9,727 (p=0,002); 2iP vs testemunha, Qs=5,638 (p=0,018); Cinetina vs BAP, Qs=4,031 (p=0,045). Aos 60 dias de cultura, houve diferença estatística entre os tratamentos com 2iP comparado com cinetina, BAP e testemunha (2iP vs Cinetina, Qs=14,686 (p<0,001); 2iP vs BAP, Qs=5,354 (p=0,021); 2iP vs testemunha, Qs=8,167 (p=0,004) (Anexo 4).

De acordo com os dados apresentados na tabela 7, observou-se que a maior percentagem de explantes intumescidos foi obtida na presença de 2iP aos 30 e 60 dias de cultura *in vitro*, sendo estatisticamente superior aos demais tratamentos,

assim como, foi a citocinina que diferiu da testemunha (sem regulador). Aos 60 dias, alguns explantes cultivados na presença de BAP e cinetina tiveram como resposta o desenvolvimento de calos (Figura 1E e Tabela 7).

Para a variável coloração, o 2iP foi a única citocinina que proporcionou um resultado diferente da testemunha, apresentando maior percentagem de explantes verdes ao fim dos 60 dias *in vitro* (Tabela 7). Nos demais tratamentos houve elevada percentagem de explantes marrons (oxidados). Assim, a concentração de 8,8 µM de 2iP foi a citocinina mais indicada para a cultura de meristemas.

TABELA 7 – COLORAÇÃO (VERDE OU MARROM) E ESTADO (INTUMESCIDO, ESTAGNADO, OU COM CALOS) DOS MERISTEMAS DE ERVA-MATE EM FUNÇÃO DA CITOCININA ADICIONADA AO MEIO DE CULTURA WPM COM 3 g.L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO E 0,2 µM DE ANA.

Citocinina (8,8 µM)	Coloração (%)		Estado (%)		Formação de Calos (%)
	Verde	Marrom*	Estagnado	Intumescido	
30 dias <i>in vitro</i>					
Cinetina	47,83	52,17	77,78	22,22	0
BAP	68,75	31,25	43,75	56,25	0
2iP	100	0	21,43	78,57	0
Testemunha	69,23	30,77	60,72	39,28	0
60 dias <i>in vitro</i>					
Cinetina	14,28	85,72	50,0	16,66	33,34
BAP	12,5	87,5	43,75	50,0	6,25
2iP	83,33	16,67	7,99	92,30	0
Testemunha	23,07	76,93	55,55	44,44	0

*Coloração referente a explantes oxidados.

3.3.1.5 Efeito do agente desinfestante

Não houve diferença estatística para variável estado (explantes intumescidos, estagnados, com formação de calos ou brotados) aos 30 dias de cultura *in vitro*, sendo também não significativo aos 60 dias *in vitro*. Da mesma forma, não foi observada diferença estatística aos 30 dias e 60 dias para a variável coloração (explantes verdes ou marrons (oxidados)) (Anexo 5). Assim não há evidências de associações entre os tratamentos e as variáveis observadas. Cabe salientar que o tratamento com hipoclorito sem álcool 70% foi excluído da análise, pois apresentou mais de 90% de contaminações, sendo este tratamento não indicado para assepsia. A não significância indica que os resultados obtidos com a utilização de hipoclorito de sódio com etanol ou cloreto de mercúrio com e sem etanol nas concentrações e tempos testados não diferem entre si.

Decorrente de todas as condições ideais dadas para este experimento, como seleção de clone mais responsivo *in vitro* (F1), meio de cultura WPM, 8,8 μM de 2iP, 0,2 μM de ANA, 3g.L⁻¹ de carvão ativado, foi obtida uma variação de 8,3, 14,28 e 5,26% de explantes brotados nos tratamentos 1, 2 e 3 respectivamente (Tabela 8), significando o primeiro relato de sucesso para cultura de meristemas de erva-mate.

TABELA 8 - EFEITO DO AGENTE DESINFESTANTE SOBRE O ESTADO DE MERISTEMAS DE ERVA-MATE PARA O CLONE F1 APÓS 30 E 60 DIAS DE CULTURA EM MEIO WPM, 3 g.L⁻¹ DE CARVÃO ATIVADO, 8,8 μM DE 2IP E 0,2 μM DE ANA.

Tratamento de desinfestação	Estado %		Formação de calos(%)	Brotado(%)
	Estagnado	Intumescido		
30 dias				
1	16,68	41,66	41,66	0,0
2	47,36	31,58	21,06	0,0
3	72,22	16,67	11,11	0,0
60 dias				
1	16,7	33,3	41,7	8,3
2	42,86	14,29	28,57	14,28
3	68,42	10,53	15,79	5,26

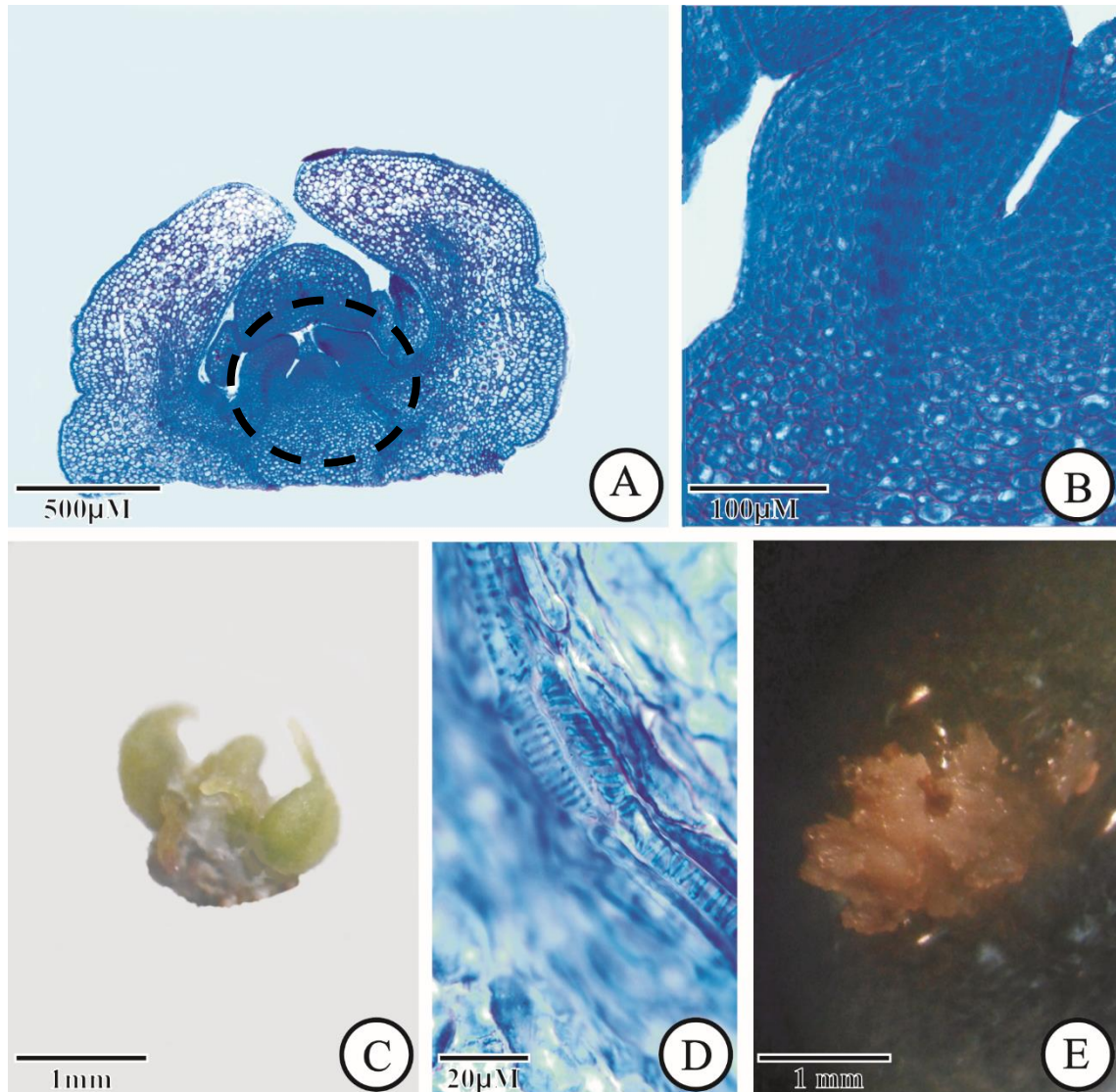
Sendo: 1: Etanol 70% por 1 min + cloreto de mercúrio 0,05% por 10 min; 2: Cloreto de mercúrio 0,05% por 10 min; 3: Etanol 70% por 1 min + hipoclorito de sódio 2,5% por 10 min.

3.3.2 Análise histológica

Na figura 1A pode-se observar uma gema do clone F1 no momento da coleta (testemunha), de maneira a comparar os tecidos nos diferentes tratamentos. Utilizou-se a gema para melhor visualização geral, porém a região introduzida *in vitro* é constituída do domo meristemático e os primórdios foliares mais internos (observar círculo na figura 1A). Na figura 1B, tem-se o aumento do primórdio mais interno da gema da figura 1A, sendo verificada a não diferenciação do procâmbio.

Na figura 1C foi apresentado um meristema brotado após 60 dias de cultivo *in vitro* (resultado obtido no item 3.3.1.5). Tais brotações estão em processo de diferenciação celular (figura 1D), e pode ser observada a diferenciação das células do procâmbio dando início à formação dos tecidos de condução. Nota-se a formação de espessamentos espiralados típicos de xilema. Na figura 1E é observado o desenvolvimento de calos obtidos no tratamento com cinetina e BAP (vide ao tópico 3.3.1.4).

FIGURA 1 – ANÁLISE HISTOLÓGICA DO MERISTEMA BROTADO E DO MERISTEMA COM FORMAÇÃO DE CALOS



LEGENDA: A- GEMA DE ERVA-MATE NO MOMENTO DA EXCISÃO DO MERISTEMA (TESTEMUNHA), CÍRCULO: REGIÃO EXCISADA E INTRODUZIDA *IN VITRO*, CONSTITUÍDA DO DOMO MERISTEMÁTICO E DOS PRIMÓRDIOS FOLIARES MAIS INTERNOS; B- AUMENTO DO PRIMÓRDIO FOLIAR MAIS INTERNO, SALIENTANDO A NÃO DIFERENCIAÇÃO DO PROCÂMBIO; C-MERISTEMA BROTADO AOS 70 DIAS *IN VITRO*; D - DETALHE DO PRIMÓRDIO FOLIAR EM DESENVOLVIMENTO AOS 70 DIAS DE CULTURA *IN VITRO* MOSTRANDO A DIFERENCIAÇÃO DO PROCÂMBIO EM TECIDOS DE CONDUÇÃO (DETALHE: ESPESSEMENTOS ESPIRALADOS TÍPICOS DE XILEMA); E- CALOGÊNESE EM MERISTEMAS.

3.3.3 Identificação de bactéria endofítica

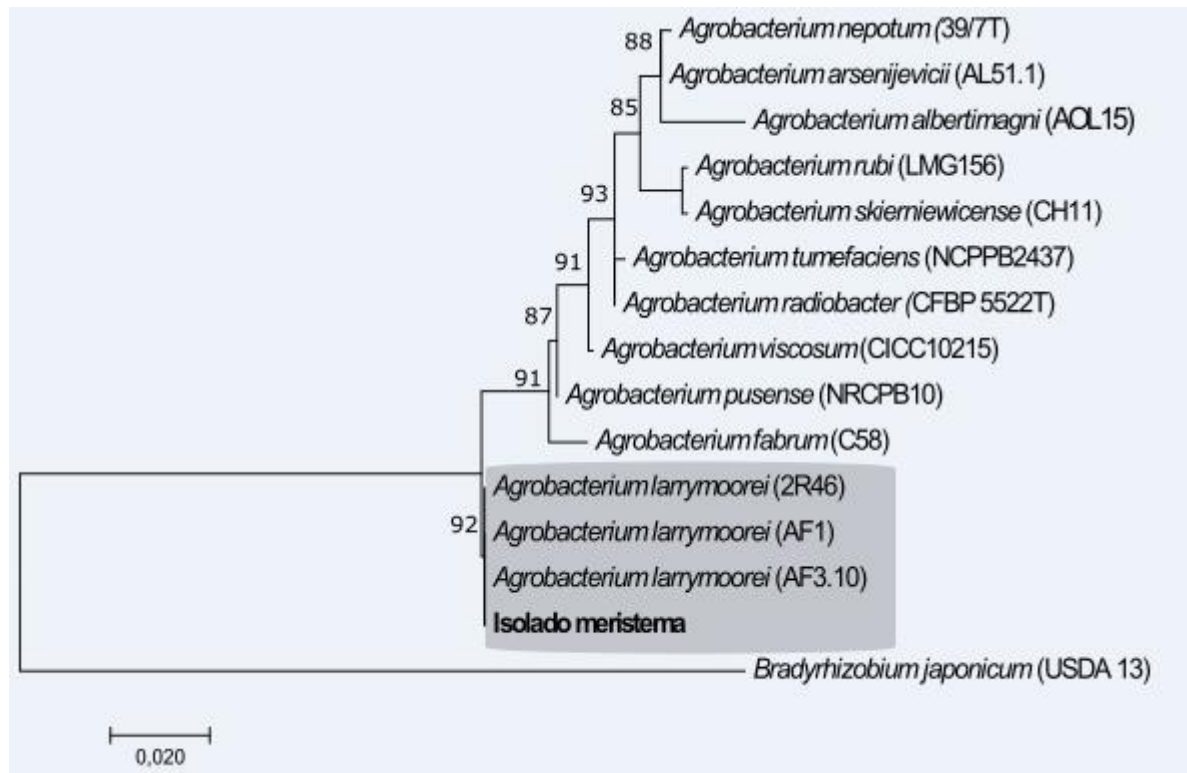
A partir da análise da sequência da região 16S do rRNA foi possível identificar o isolado do meristema de erva-mate como *Agrobacterium larrymoorei*. Para essa

análise foram utilizadas linhagens de referência depositadas no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Tabela 9). A árvore filogenética (Figura 2) foi gerada com Maximum Likelihood utilizando o modelo evolutivo Kimura 2 Parâmetros. A proporção de gaps e caracteres indeterminados do alinhamento foi de 0,22, com 33 padrões de alinhamento distintos. A sequência empírica de bases apresentou uma frequência de (A): 0,231; (T): 0,231; (C): 0,269; (G): 0,269 com bootstrap de 1000 repetições. A sequência da bactéria isolada foi depositada no Genbank sendo localizada pelo número de acesso (KU728165). Na figura 3 pode ser observada a bactéria no interior dos tecidos em microscopia eletrônica de varredura. Cabe salientar que a bactéria ainda não havia sido visualizada no meio de cultura aos 30 dias *in vitro*, mas estava presente internamente nos tecidos do meristema.

TABELA 9 – LINHAGENS DE REFERÊNCIA

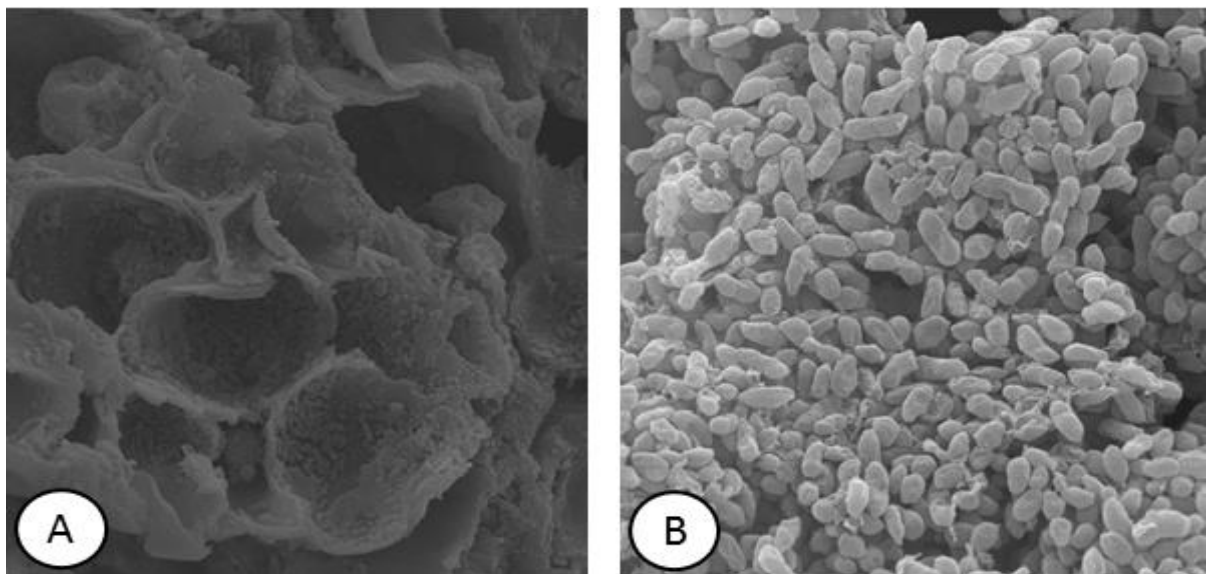
Espécie	Linhagem	Fonte / Origem geográfica	Genbank (16S rRNA)
<i>Agrobacterium albertimagni</i>	AOL15	superfície foliar de <i>Potamogeton pectinatus</i> / USA	AF316615
<i>Agrobacterium nepotum</i>	39/7T	tumores de <i>Prunus cerasifera</i> / Hungria	FR870231
<i>Agrobacterium arsenijevicei</i>	AL51.1	tumores de <i>Prunus cerasifera</i> / Polônia	LN827917
<i>Agrobacterium rubi</i>	LMG156	tumores de <i>Rubus ursinus</i> var. <i>loganobaccus</i> / USA	X67228
<i>Agrobacterium skirniawicense</i>	CH11	tumores de <i>Chrysanthemum</i> L / Polônia	HQ823551
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	NCPB2437	coleção nacional de bactérias patogênicas de plantas / USA	D14500
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	CFBP 5522T	- / Holanda	AB247615
<i>Agrobacterium viscosum</i>	CICC10215	-	AY794055
<i>Agrobacterium pusense</i>	NRCPB10	Solo / Índia	FJ969841
<i>Agrobacterium fabrum</i>	C58	tumores de <i>Prunus cerasifera</i> / -	NR_074266
<i>Agrobacterium larrymoorei</i>	2R46	superfície foliar de arroz / China	EF178437
<i>Agrobacterium larrymoorei</i>	AF1	superfície foliar de arroz / Afeganistão	LC015599
<i>Agrobacterium larrymoorei</i>	AF3.10	tumores de <i>Ficus benjamina</i> / EUA	Z30542
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	USDA 136	- / EUA	L23331

FIGURA 2 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE ISOLADO ENDOFÍTICO DO MERISTEMA DE *Ilex paraguariensis*,



LEGENDA: Árvore de Máxima Verossimilhança da região do gene 16S rRNA, indicando a posição filogenética do isolado do meristema e sua relação com as outras espécies do gênero *Agrobacterium*.

FIGURA 3 - *Agrobacterium larrymoorei* NOS TECIDOS INTERNOS DO MERISTEMA ISOLADO AOS 30 DIAS *IN VITRO*



LEGENDA: Fotomicrografia eletrônica de varredura: A – aumento de 5500X; B – aumento de 20000X.

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Estabelecimento *in vitro* de meristemas de erva-mate

A superioridade do meio WPM para os meristemas de erva-mate (61,8% de explantes intumescidos ao fim de 60 dias de cultivo *in vitro*) pode ser atribuída ao fato deste meio de cultura possuir menores concentrações de nitrogênio e potássio quando comparado ao meio MS, o qual contém altas concentrações de sais, sobretudo os íons nitrato e amônio (Anexo 2). A melhor resposta também pode ser atribuída a vitamina tiamina, a qual é superior no meio WPM (Anexo 1 e 2). Mesmo que o meio diluído $\frac{1}{2}$ MS não tenha fornecido resultados diferentes do meio WPM para coloração aos 60 dias *in vitro*, sendo observado nestes meios maiores percentagens de explantes verdes (43,9 e 54,7 respectivamente), o meio WPM permanece o mais indicado para cultura de meristemas de erva-mate, pois, a percentagem de explantes intumescidos foi superior neste meio quando comparado com todos os outros, foram verificadas baixas percentagens de explantes intumescidos nos meios $\frac{1}{2}$ MS, $\frac{1}{4}$ MS e MS. Porém, para poder afirmar qual composto presente no meio de cultura WPM é responsável pela melhor resposta dos explantes, estudos específicos com compostos isolados deverão ser desenvolvidos.

O meio WPM também foi superior para segmentos nodais de erva-mate na pesquisa de ZANIOLO E ZANETTE (2001), assim como para segmentos nodais de outras espécies lenhosas como *Cordia trichotoma* (louro pardo) (MANTOVANI et al., 2001), *Pyrus pashia* (pereira do Himalaya) (HU, 2015) e meristemas de *Prunus avium* (cerejeira) (MOGHADAM e ZAMANIPOUR, 2015). Para ápices caulinares do arbusto pascuíta (*Euphorbia leucocephala*), o meio WPM resultou em brotos mais grossos, folhas com maior conteúdo de clorofila, e maior acumulação de matéria seca, quando comparado com os meios MS, MS $\frac{1}{4}$, MS $\frac{1}{2}$ e WPM com diferentes variações de sais (MARTÍNEZ-VILLEGAS et al., 2015).

Nos trabalhos de cultura *in vitro* de erva-mate que constam na literatura, os autores utilizaram meio de cultura $\frac{1}{4}$ MS (SANSBERRO et al., 1998; SANSBERRO et al., 1999; SANSBERRO et al., 2000; HÖRNER et al., 2001; SANSBERRO et al., 2001A; SANSBERRO et al., 2001B; REY et al., 2002; MROGINSKI et al., 2008; HORBACH et al., 2011). A utilização desse meio em um grande número de trabalhos se deve às pesquisas anteriores realizadas com erva-mate, nas quais foram

testados somente o meio de cultura MS e suas variações salinas: $\frac{1}{2}$ MS, $\frac{1}{4}$ MS e $\frac{1}{8}$ MS (REY e MROGINSKI, 1988; MROGINSKI et al., 1999; REY et al., 1991) e que mostraram a superioridade do $\frac{1}{4}$ MS.

Não somente o meio de cultura, mas também os reguladores de crescimento e o genótipo afetam as respostas morfogênicas *in vitro* (OLIVEIRA et al, 2010). O efeito do genótipo pôde ser observado no experimento comparando os vários clones (numerado 3.3.1.2), sendo determinado um genótipo com alta taxa de oxidação (A03-87,18%), outro intermediário (A07-65,8%) e dois com menores percentagens de oxidação (F1-43,59%) e (F2-37,84%). Efeito do genótipo também foi observado para meristemas de cerejeira (*Prunus avium*) *in vitro*; onde, os autores obtiveram diferentes respostas de sobrevivência de meristemas (55,5% e 38,96%) para as cultivares "Hajyusefi" e "Zard" respectivamente (MOGHADAM e ZAMANIPOUR, 2015). Segundo FURTADO et al. (2007) é fundamental que protocolos sejam adaptados para cada material vegetal utilizado. Assim, um protocolo de estabelecimento *in vitro* que foi eficiente para erva-mate em dada pesquisa, quando aplicado em outra, nas mesmas condições ambientais mas com genótipo diferente, pode não apresentar a mesma resposta.

A produção de substâncias marrons nos tecidos das plantas é causada principalmente pela oxidação enzimática (polifenoloxidase) de compostos fenólicos (ZHOU et al.; 2010) ocasionando, não raramente, a morte dos explantes pela produção de substâncias tóxicas (quinonas) e pela obstrução do tecido oxidado, resultando na não absorção dos nutrientes do meio de cultura pelos tecidos (COSTA et al., 2006; KARIYANA e KARIYANA, 2013). A oxidação enzimática dos compostos fenólicos propriamente dita, pode ser resultante de vários fatores, entre eles a citocinina, o nitrogênio e açúcar adicionados ao meio de cultura (WOJTANIA et al., 2015). Em alguns casos a presença de aspectos oxidativos, embora indesejados, não inviabiliza o estabelecimento das culturas *in vitro* (GOLLE et al., 2012), fato este que não ocorre com meristemas da erva-mate, pois, uma vez os tecidos em processo oxidativo, evoluem para necrose e não há estabelecimento *in vitro*.

O efeito positivo do carvão ativado para o clone F1 na concentração de 3g.L^{-1} (81,12% de explantes verdes) se deve ao modo de ação deste composto, uma vez que ele é um adsorvente forte (ZHOU et al.; 2010) apresentando maior adsorção de compostos aromáticos, como é o caso dos produtos resultantes do processo oxidativo e polifenóis, mas também auxinas e citocininas (PAN e VAN STADEN,

1998). Trabalhos citados na literatura apontam resultados positivos com a utilização de carvão ativado no controle da oxidação (COSTA et al., 2006; SOUZA et al., 2014) mas, quando se trata de desenvolvimento versus efeito do carvão ativado, a inibição ou promoção do crescimento *in vitro* depende da espécie e do tecido utilizado (PAN e VAN STADEN, 1998).

Efeitos positivos da utilização de carvão ativado na concentração de 3 g.L⁻¹ já foram citados na literatura para meristemas de teca (*Tectona grandis*), sendo tal concentração essencial para obtenção de 60% de meristemas viáveis para as próximas etapas de cultivo *in vitro* (ANDRADE, 2010), assim como para segmentos nodais de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), reduzindo a taxa de oxidação de 50% para 1,8% (COSTA et al., 2007).

A citocinina 2iP proporcionou melhores resultados (83,33% de explantes verdes) ao passo que BAP e cinetina foram as que apresentaram maior efeito fitotóxico com mais de 80% de explantes oxidados ao fim de 60 dias de cultivo *in vitro*. O fato da testemunha também apresentar alta percentagem de oxidação (76, 93%) pode ser devido à escassez dos hormônios endógenos aos 60 dias *in vitro* resultando no acentuado processo de morte celular.

No trabalho desenvolvido por BORGES et al. (2004) para a espécie *Acacia mearnsii* (acácia negra), os autores verificaram respostas positivas na multiplicação de gemas axilares exercida pela citocinina BAP e cinetina, ao passo que 2iP não apresentou efeito significativo sobre a multiplicação. Resultados semelhantes foram observados por SCHUCH et al. (2008) com explantes do tipo segmentos caulinares da espécie *Vaccinium ashei* (mirtilo), em que houve reduzido desenvolvimento de brotações múltiplas na presença de 2iP, se comparado com a zeatina. Esses resultados confirmam ser o 2iP uma citocinina fraca, se comparada com as demais, consequentemente menos agressiva para os tecidos, resultando em menores taxas de oxidações dos explantes de erva-mate.

Em estudos futuros, se faz necessário testar diferentes concentrações da citocinina 2iP no meio de cultura, visando elucidar o efeito destas concentrações nos tecidos e também sua interação com o carvão ativado. Estudos semelhantes já foram desenvolvidos por SARTOR et al. (2013) com a espécie *Dalbergia nigra* (jacarandá da bahia) no qual foram testadas diferentes concentrações de BAP até um valor máximo de 18 µM para explantes do tipo meristemas apicais e gemas axilares. Da mesma maneira, LEITZKE et al. (2010) utilizaram explantes do tipo

segmentos nodais caulinares da espécie *Morus nigra* (amoreira preta cultivar 'Xavante') e observaram efeito positivo no número de brotações até uma concentração máxima de 15,5 μM de BAP e zeatina e um decréscimo na concentração de 22,5 μM .

Em alguns explantes houve o desenvolvimento de calos, o que pode ser explicado pelo tipo da citocinina utilizada, mas também pela concentração endógena de hormônios vegetais, que, ao interagir com os reguladores exógenos, favoreceram o balanço hormonal para o desenvolvimento de calos. Segundo MONFORT et al. (2012), o balanço, a interação, e a concentração endógena de hormônios do explante determinam os processos morfogénéticos *in vitro*, assim como, a eficácia do regulador exógeno utilizado (PANDE et al., 2015). O efeito endógeno dos hormônios vegetais, pode ser observado no estudo de MORAIS et al. (2014) com segmentos nodais de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L.), os quais atingiram maior comprimento de brotos em meio sem regulador vegetal, sendo que a adição de reguladores inibiu o alongamento.

3.4.2 Identificação de bactéria endofítica

A espécie bacteriana isolada de meristemas de erva-mate neste trabalho (*Agrobacterium larrymoorei*) difere da bactéria isolada por LUNA et al. (2013) em segmentos nodais de *Ilex paraguariensis* (*Stenotrophomonas malthophilia*) assim como das isoladas em *Ilex dumosa* (*S. malthophilia* e *Achromobacter* sp.) (LUNA et al., 2008). Este fato pode ser explicado uma vez que os organismos endofíticos podem variar em função do hospedeiro, da distribuição geográfica, idade da planta e condições ecológicas (ARNOLD et al., 2003). A interação entre endofítico e microplanta vai muito além da espécie vegetal, podendo até se tratar de uma especificidade entre clones ou mesmo entre indivíduos de um mesmo clone (BATAGIN-PIOTTO, 2013).

A espécie *A. larrymoorei* foi isolada pela primeira vez a partir de tumores desenvolvidos em *Ficus benjamina* (BOUZAR et al., 1995), porém, sua nomenclatura só foi estabelecida por BOUZAR e JONES em (2001). Atualmente, apesar da discussão no meio acadêmico pela troca ou não de várias espécies do gênero *Agrobacterium* para *Rhizobium*, *A. larrymoorei* é mantida no gênero *Agrobacterium* (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2015; KUZMANOVIC et al., 2015).

A. larrymoorei é uma bactéria de solo, gram-negativa, capaz de degradar vários substratos de carbono como L-arabinose, D-arabitol, celobiose, D-frutose, D-galactose, m-inositol, maltose, sacarose, glicose 1-fosfato, glicose 6-fosfato, entre outros; também foi a única espécie do gênero *Agrobacterium* incapaz de metabolizar ácido cis-aconítico (BOUZART e JONES, 2001). Tal bactéria já foi identificada em outras espécies de plantas como *Oryza sativa* (MANO et al., 2006), *Solanum tuberosum* (MOROHOSHI et al., 2009), *Zea mays* (LIU et al., 2013) e *Zingiber officinale* (CHEN et al., 2014).

Neste trabalho, levantou-se a hipótese que a bactéria (*Agrobacterium larrymoorei*) afetou o estabelecimento *in vitro* dos meristemas de erva-mate da seguinte forma: quando introduzido os meristemas *in vitro*, foi gerada uma injúria nos tecidos da planta decorrente do isolamento dos meristemas, além da modificação das condições do ambiente (luz, temperatura, umidade relativa, concentração de CO₂ etc) e condições químicas (agente desinfestante, meios de cultura e reguladores vegetais, etc). Com isso, caso o explante não consiga se estabelecer *in vitro*, a bactéria, após utilizar os substratos de carbono disponíveis no interior da planta para sua sobrevivência, migra para o meio de cultura, sendo este rico em fonte de carbono, principalmente sacarose. O resultado é a morte do explante, pelo rápido crescimento bacteriano, que acaba tomando conta do meio de cultura. Porém, se o meristema consegue se estabelecer, não há o aparecimento da bactéria no meio de cultura, e a relação positiva planta/endófito volta a ocorrer.

Agrobacterium larrymoorei, assim como *A. tumefaciens* apresenta o plasmídeo conjugativo denominado Ti, sendo capaz de causar tumores em plantas, como foi verificado por BOUZAR et al. (1995). Segundo ANDRADE et al. (2003) esse plasmídeo pode ser perdido em condições de estresse. Para erva-mate, não foi verificado desenvolvimento de tumores *in vitro* e também não foi visível nenhum sintoma nas plantas mantidas em viveiro.

O aparecimento de bactérias endofíticas já foi citado na literatura para explantes do tipo meristemas em abacaxi (*Ananas comosus*) (ABREU-TARAZI et al., 2010) e cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) (CHA-UM et al., 2006). Para a cana de açúcar, o tamanho do meristema excisado determinou o aparecimento das bactérias, sendo que, explantes com 1,5 mm resultaram em maior taxa de aparecimento de bactérias, já meristemas com 0,5 mm resultaram em culturas livres de bactérias, porém, menos responsivas *in vitro*.

3.5 CONCLUSÕES

Resultados positivos para o estabelecimento de meristemas de erva-mate do clone F1, em meio WPM com 8,8 μM de 2iP, 0,2 μM de ANA e 3 g.L^{-1} de carvão ativado foram relatados pela primeira vez neste trabalho, e a bactéria endofítica *Agrobacterium larrymoorei* foi identificada pela primeira vez nesta espécie vegetal.

3.6 REFERÊNCIAS

ACQUADRO, A.; PAPANICE, M. A.; LANTERI, S.; BOTTALICO, G.; PORTIS, E.; CAMPANALE, A.; FINETTI-SIELER, M. M.; MASCIA, T.; SUMERANO, P.; GALLITELL, D. Production and fingerprinting of virus-free clones in a reflowering globe artichoke. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 100, p. 329-337, 2010.

AGRESTI, A. **Categorical data analysis**, 2ed. New York: Wiley, 2002.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-402, 1997.

ANDRADE, G. M.; SARTORETTO, L. M.; BRASILEIRO, A. C. M. Biologia molecular do processo de infecção por *agrobacterium* spp - Revisão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 5, p. 465-476, 2003.

ANDRADE, W. F.; **Indução de rejuvenescimento de Teca (*Tectona grandis* L. f) através de enxertia seriada e micropropagação**. 76 f. Tese (Doutorado em ciências) – Departamento de Ciências Florestais, Universidade de São Paulo – Escola Superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

ARNOLD, A. E.; MEJIA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 26, p. 15649–15654, 2003.

AROONPONG, P.; CHANG, J. C. Micropropagation of a difficult-to-root weeping mulberry (*Morus alba* var. Shidareguwa): A popular variety for ornamental purposes, **Scientia Horticulturae**, v. 194, p. 320-326, 2015.

AZEVEDO, R. M., MAIALE, S. J., PESSINO, S. C; BOTTINI, R; RUIZ, O. A; SANSBERRO, P. A. A succinate dehydrogenase flavoprotein subunit-like transcript is upregulated in *Ilex paraguariensis* leaves in response to water deficit and abscisic acid. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 64, p. 48-54, 2013.

BAYOUDH, C.; LABIIDI, R.; MAJDOUB, A.; MARS, M. In vitro propagation of caprifig and female fig varieties (*Ficus carica* L.) from shoot-tips. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 17, p. 1597-1608, 2015.

BERTOZZO, F.; MACHADO, I. S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 6, p. 1477-1482, 2010.

BITENCOURT, J.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I.; KOEHLER, H. S. Enraizamento de estacas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St-Hill.) provenientes de brotações rejuvenescentes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 3, p. 277-281, 2009.

BONFIELD, J.; BEAL, K.; JORDAN, M.; CHEN, Y.; STADEN, R. **The Staden Package Manual**. Copyright, 2002.

BORGES, N. J.; SOBORSA, R. C.; CODER-MARTINS, M. P. Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia negra (*Acacia mearnsii* De Wild). **Revista Árvore**, v. 28, n. 4, p. 493-498, 2004.

BOUZAR, H.; JONES, J. B. *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1023-1026, 2001.

BOUZAR, H.; CHILTON, W. S.; NESME, X.; DESSAUX, Y.; VAUDEQUIN, V.; PETIT, A.; JONES, J. B.; HODGE, N. C. A New *Agrobacterium* strain isolated from aerial tumors on *Ficus benjamina* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 65-73, 1995.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. il. color. (Coleção espécies arbóreas brasileiras, v. 1).

CHATENET, M.; DELAGE, C.; RIPOLLES, M. Detection of sugarcane *yellow leaf virus* in quarantine and production of virus-free sugarcane by apical meristem culture. **Plant Disease**, v. 85, n. 11, 2001.

CHA-UM, S.; HIEN, N. T. T.; KIRDMANEE, C. Disease-free production of sugarcane varieties (*Saccharum officinarum* L.) using *in vitro* meristem culture. **Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 443-448, 2006.

CHEN, T.; CHEN, Z.; MA, G. H.; DU, B. H.; SHEN, B.; DING, Y. Q.; XU, K. Diversity and potential application of endophytic bacteria in ginger. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 4918-4931, 2014.

CONCI, V. V.; NOME, F. S. Virus free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. **Journal of Phytopathology**, v. 132, p. 186-192, 1991.

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. Efeito da interação entre carvão ativado e N⁶- Benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, CV. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.

COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; MENDONÇA, A. B.; AMANCIO, V. F.; LEDO, A. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 068-072, 2007.

DEBAT, H. J.; GRABIELE, M.; AGUILERA, P. M.; BUBILLO, R.; ZAPATA, P. D.; MARTI, D.A.; DUCASSE, D. A. The complete genome of a putative endornavirus identified in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Virus Genes**, v. 49, n. 2, p. 348-350, 2014.

DERAL (Departamento de Economia Rural). **Produtos Florestais** – Erva-mate. 2014.

DUTRA, L. F.; SILVA, N. D. G. **Estabelecimento *in vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St-Hil)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 7 p. (Embrapa Clima temperado. Comunicado técnico, 2009).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO): STATISTICS DIVISION. Data base: Production. 2013. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>>, acesso em 13 outubro 2015.

FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A. **Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação da erva-mate**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000, p. 1-5. (Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 45).

FURTADO, C. M.; CARVALHO, J. M. F. C.; CASTRO, J. P.; SILVA, H. Comparação da frequência de regeneração *in vitro* do amendoim (*Arachis hipogaea*), utilizando diferentes citocininas. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v. 7, n. 1, p. 51-58, 2007.

GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure – background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**, vol. 1. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; LEÓN, E. A. B. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: Influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, v. 22, n.1, p. 207-214, 2012.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. v.1, p.183-260.

GRIEBELER, A. G.; CONSATTI, G.; FREITAS, E. M.; SPEROTTO, R. A. Optimal culture conditions for the initial development of *Ilex paraguariensis* A. St-Hil. explants. **Acta Botanica Brasilica**, v. 28, n. 4. p. 548-551. 2014.

GROUT, B. W. W. Meristem-Tip Culture for Propagation and Vírus elimination. In: WALKER, J. M. **Plant Cell Culture Protocols**. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. 1999, p. 115-126.

HORBACH, M. A. **Propagação *in vitro* e *ex vitro* de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire – Aquifoliaceae)**. 63 f. Dissertação (Mestrado em

Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

HORBACH, M. A.; BISOGNIN, D. A.; KIELSE, P.; QUADROS, Q. M.; FICK, T. A. Micropropagação de plântulas de erva-mate obtidas por embriões zigóticos. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 113-119, 2011

HÖRNER, L. DE. A.; AUGUSTIN, L.; FORCELINI, C. A.; MIELKE, M. S.; SUZIN, M.; DENARDIN, N. D. Micropropagação de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 7, n. 1, p. 87-96, 2001.

HSU, Y. H.; ANNAMALAI, P.; LIN, C. S.; CHEN, Y. Y.; CHANG, W. C.; LIN, N. S. A sensitive method for detecting bamboo mosaic virus (BaMV) and establishment of BaMV-free meristem-tip cultures. **Plant Pathology**, v. 49, p. 101-107, 2000.

HU, C. Y. In vitro culture of rudimentar embryos of eleven *Ilex* species. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.100, n. 3, p. 221-225. 1975.

HU, R. *In vitro* propagation of kaimth (*Pyrus pashia*) using explants from forced cutting. **Journal of Horticulture**, v. 1, n. 2, 2015.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York, Mc Grow – Hill Book Co. Inc, 523 p, 1940.

KARIYANA, N.; KARIYANA, K. Effect of ascorbic acid, activated charcoal and light duration on shoot regeneration of banana cultivar Barangan (*Musa acuminata* L.) *in vitro* culture. **IJRRAS**, v. 15, n. 1, p. 13-17, 2013.

KUMAR, S.; KHAN, M. S.; RAJ, S. K.; SHARMA, A. K. Elimination of mixed infection of *Cucumber mosaic* and *Tomato aspermy* virus from *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Pooja by shoot meristem culture. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 108-112, 2009.

KUZMANOVIC, N.; PULAWSKA, J.; PROKIC, A.; IVANOVIC, M.; ZLATKOVIC, N.; JONES, J. B.; OBRADOVIC, A. *Agrobacterium arsenijevicii* sp. nov., isolated from crown gall tumors on raspberry and cherry plum. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, p. 373-378, 2015.

LEITZKE, L. M.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Influência do meio de cultura tipo e concentração de citocinina na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 2, p. 352-360, 2010.

LEONE, G. F.; ALMEIDA, C. V.; ABREU-TARAZI, M.; BATAGIN-PIOTTO, K. D.; ARTIOLI-COELHO, F. A.; ALMEIDA, M. Antibioticoterapia em microplantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus*). **Ciência Rural**, v. 46, n. 1, p. 89-94, 2016.

LIU, Y.; ZUO, S.; ZOU, Y.; WANG, J.; SONG, W. Investigation on diversity and population sucession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L., Nongda108) at different growth stages. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 71-79, 2013.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant propagation Society Proceedings**, v. 30, p. 421-327, 1980.

LLYAS, S.; NAZ, SHAGUFTA.; JAVAD, S.; SHEHZDI, K.; TARIQ, A.; MUNIR, N.; ALI, AAMIR. Influence of cytokinins, sucrose and pH on adventitious shoot regeneration of *Polyscias balfouriana* (Balfour aralia). **Global Journal of Medicinal Plants Research**, v. 1, n. 1, p. 31-37, 2013.

LUNA, C.; ACEVEDO, R.; GONZÁLEZ, A.; COLLAVINO, M.; MROGINSKI, L.; SANSBERRO, P. Endopytic bacteria from *Ilex paraguariensis* shoot cultures: localization, characterization, and response to isothiazolone biocides. **In vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 49, n. 326-332, 2013.

LUNA, C.; COLLAVINO, M.; MROGINSKI, L.; SANSBERRO, P. Identification and control of bacterial contaminants from *Ilex dumosa* nodal segments culture in a temporal immersion bioreactor system using 16 S rDNA analysis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 95, p. 13-19, 2008.

MANO, H.; TANAKA, F.; NAKAMURA, C.; KAGA, H.; MORISAKI, H. Culturable endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. **Microbes and Environments**, v. 22, n. 2, p. 175-185, 2007.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração in vitro de Louro Pardo (*Cordia Trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal**, v. 11, n. 2, p. 93-101, 2001.

MARTÍNEZ-VILLEGAS, Y. M.; ANDRADE-RODRÍGUEZ, M.; COLINAS-LEÓN, T.; VILLEGAS-TORRES, O. G.; CASTILLO-GUTIÉRREZ, A.; ALIA-TEJACAL, I. Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuíta (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 38, n. 4, p. 369-374, 2015.

MEENA, R. K.; GOUR, K.; PATNI, V. Production of leaf curl virus – free chilli by meristem tip culture. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 25, n. 2, p. 67-71, 2014.

MOGHADAM, E. G.; ZAMANIPOUR, M. Initiation phase of meristem culture of *Prunus avium* cvs. “Hajyusefi” and “Zard”. **International Journal Biosciences**, v. 6, n. 2, p. 283-290, 2015.

MONFORT, L. E. F.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ROSSI, Z. T.T.; SANTOS, F. M. Efeito do BAP no cultivo *in vitro* de *Ocimum selloi* Benth. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 3, p. 458-463, 2012.

MORAIS, T. P.; ASMAR, S. A.; LUZ, J. M. Q. Reguladores de crescimento vegetal no cultivo *in vitro* de *Mentha x Piperita* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 2, p. 350-355, 2014.

MOROHOSHI, T.; SOMEYA, N.; IKEDA, T. Novel N-Acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from the leaf surface of *Solanum tuberosum* and their quorum-quenching properties. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 73, n. 9, p. 2124-2127, 2009.

MROGINSKI, L. A.; REY, H. Y. Regeneración de plantas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) por cultivo in vitro de ápices caulinares y de segmentos nodales. **Phyton**, v. 48, p. 139-145, 1988.

MROGINSKI, L. A.; ROUVIER, S. M.; FABISIK, J. C.; LEVIT, M.; MARSSI, M. A.; SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y. Effect of medium composition and light supply on *in vitro* shoot proliferation in *Ilex paraguariensis* (aquifoliaceae). **Journal of Plant Nutrition**, v. 22, n. 2, p. 359-368, 1999.

MROGINSKI, L. A.; SANSBERRO, P. A.; SCOCCHI, A. M.; LUNA, C.; REY, H. Y. A cryopreservation protocol for immature zygotic embryos of species of *Ilex* (Aquifolisceae). **Biocell**, v. 32, n. 1, p. 33-39, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, M. L. P.; COSTA, M. G. C.; SILVA, C. V.; OTONI, W.C. Growth regulators, culture media and antibiotics in the in vitro shoot regeneration from mature tissue of citrus cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 7, p. 654-660, 2010.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate. In: Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais: silvicultura da erva-mate, 10, 1983, Curitiba, **Anais...Curitiba: URRPFCS**, 1983. p. 17-35. (EMBRAPA- URRPFCS. Documentos, 25).

ORMENO-ORRILLO, E.; SERVÍN-GARCIDUEÑAS, L. E.; ROGEL, M. A.; GONZÁLEZ, V.; PERALTA, H.; MORA, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, p. 287-291, 2015.

PALÚ, E. G.; KRAUSE, S.; SILVA, L. M.; HUNHOFF, V. L.; DALBOSCO, E. Z. Meios nutritivos no estabelecimento in vitro de figueira. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 9, p. 1281, 2014.

PAN, M. J.; VAN STADEN, J. The use of charcoal in in vitro culture – A review. **Plant Growth Regulation**, v. 26, p. 155–163, 1998.

PANDE, A.; DOSAD, S.; CHAWLA, H. S.; ARORA, S. In-vitro organogenesis and plant regeneration from seed-derived callus cultures of finger millet (*Eleusine coracana*). **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, n. 1, p. 19-23, 2015.

PIOTTO, K. D, B. **Atuação de manifestação bacteriana no desenvolvimento in vitro de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage**. 158 f. Tese (Doutorado em Ciências) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

R CORE TEAM. R. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016.

RESENDE, D. V. M.; STURION, A. J.; CARVALHO, P. A.; SIMEÃO, M. R.; FERNANDES, S. C. J. **Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela Embrapa: resultados da avaliação genética de populações, progênies,**

indivíduos e clones. Colombo: Embrapa Florestas, 2000, 60 p. (Embrapa Florestas. Circular Técnica, 43).

REY, H. Y.; BURTNIK, O. J.; SANSBERRO, P. A.; MROGINSKI, L. A. Medios de cultivo para el para establecimiento *in vitro* de explantes de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **Turrialba**, v. 41, n.3, p. 306-310, 1991.

REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A. Regeneración de plantas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) por cultivo in vitro de ápices caulinares y segmentos nodales. **Phyton**, v.48, n.1-2, p. 139-145, 1988.

REY, H. Y.; SANSBERRO, P. A.; COLLAVINO, M. M.; DAVIÑA, J. R.; GOLZÀLEZ, A. M.; MROGINSKI, L. A. Colchicina, trifluralin and oryzalin promoted development of somatic embryos in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Euphytica**, v. 123, p. 49-56, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T.; SPRING, H. L. C. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed. Colc Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A.; COLLAVINO, M. M. In vitro culture of rudimentary embryos of *Ilex paraguariensis*: Responses to exogenous cytokinins. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 17, n. 101-105, 1998.

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A.; COLLAVINO, M. M. *In vitro* plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. v. 35, p. 401-4002, 1999.

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; BERNARDIS, A.; LUNA, C.; COLLAVINO, M. M.; MROGINSKI, L. A. Plant regeneration of *Ilex paraguariensis* (aquifoliaceae) by *in vitro* culture of nodal segments. **Biocell**, v. 24, n.1, p. 53-63, 2000.

SANSBERRO, P. A.; LUIS, A.; MROGINSKI, L. A.; BOTTINI, R. *In vitro* morphogenetic responses of *Ilex paraguariensis* nodal segments treated with diferente gibberellins and prohexadione-Ca. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 209-214, 2001A

SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A. *In vitro* culture of zygotic Embryos of *Ilex* species. **HortScience**, v. 36, n. 2, p. 351-352, 2001B.

SANTOS, D. C. DOS.; WENDLING, I. Avaliação de meios de cultura e métodos de desinfestação de explantes de plantas adultas de erva-mate. **Biofar**, v. 4, n. 2, p. 34-42, 2010.

SANTOS, D. C.; WENDLING, I. Avaliação de meios de cultura e métodos de desinfestação de explantes de plantas adultas de erva-mate. **BioFar**, v. 4, n. 2, p. 34-42, 2010.

SARTOR, F. R.; ZANOTTI, R. F.; PÔSSA, K. F.; PILON, A. M.; FUKUSHIMA, C. H. Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do jacarandá da bahia. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 408-411, 2013.

SCHUCH, M. W.; DAMIANI, C. R.; SILVA, L. C.; ERIG, A. C. Micropropagação como técnica de rejuvenescimento em mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cultivar clímax. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 814-820, 2008.

SILVA, L. P.; ROGALSKI, M.; MORAES, L. K. A.; FESLIBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M. P. Estabelecimento e multiplicação in vitro de porta enxertos de *Prunus*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 297-300, 2003.

SOUZA, A. P. R.; SILVA, S. R.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J. Antioxidantes e ausência de luz no desenvolvimento in vitro de *Schomburgkia crista* Lindl. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 333-342, 2014.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, N.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using Maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-9, 2011.

TARAZI, M. F. A. **Comunidade bacteriana endofítica em microplantas de abacaxizeiro: estrutura, diversidade e sua influência na sua morfofisiologia após antibioticoterapia**. 138 f. Tese (Doutorado em ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

TARRAGÓ, J.; FILIP, R.; MROGINSKI, L.; SANSBERRO, P. Influence of the irradiance on phenols content and rooting of *Ilex paraguariensis* cuttings collected from adult plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, p. 2419-2424, 2012.

VERMA, N.; RAM, R.; HALLAN, V.; KUMAR, K.; ZAIDI, A. A. Production of *Cucumber mosaic virus*-free chrysanthemums by meristem tip culture. **Crop Protection**, v. 23, p. 469-473, 2004.

VICENTE, V. A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M. R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, L. M.; NAJAFZADEH, M. J.; HOOG, G. S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v. 61, n. 137-144, 2008.

WENDLING, I.; BRONDANI, G. E.; BIASSIO, A.; DUTRA, L. F. Vegetative propagation of adult of *Ilex paraguariensis* trees through epicormic shoots. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 1, p. 117-125, 2013.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F. Solução Nutritiva para condução de minicepas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) em sistema semi-hidropônico. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. 4p. (Embrapa Florestas. Circular Técnica 157).

WOJTANIA, A.; SKRZYPEK, E.; GABRYSZEWSKA, E. Effect of cytokinin, sucrose and nitrogen salts concentrations on the growth and development and phenolics content. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, v. 14, n. 3, p. 51-62, 2015.

ZANIOLO, R. S.; ZANETTE, F. Micropropagação de erva-mate a partir de segmentos nodais. **Scientia Agraria**, v.2, n. 1, 2001.

ZHOU, BIN.; WEN, X.; WANG, R.; JIA, J. Quantification of the enzymatic browning and secondary metabolites in the callus culture system of *Nigella glandulifera* Freyn et Sint. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v. 5, n. 3, p. 109-116. 2010.

4 CAPÍTULO 2

METABÓLITOS POLARES DE GEMAS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St – Hil)

RESUMO

A erva-mate é uma planta de grande importância econômica para a região sul do Brasil, além do uso tradicional para o preparo do chimarrão. Apresenta muitos compostos bioativos entre eles metilxantinas, compostos fenólicos e saponinas. O objetivo deste trabalho foi identificar e quantificar os compostos polares presentes em gemas coletadas de minicepas mantidas em casa de vegetação no sistema semi-hidropônico de quatro clones comerciais de erva-mate denominados F1, F2, A03 e A07 no momento da coleta, assim como, fazer inferências sobre como estes metabólitos poderiam vir a influenciar o estabelecimento *in vitro* destas gemas. Foram utilizadas gemas recém-coletadas e, após extração dos compostos e derivatização, as amostras foram analisadas utilizando cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa. Foram identificados compostos fenólicos como quercetina, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido quínico, assim como metabólitos primários: monossacarídeos como glicose, frutose, e ribose; açúcares álcoois como manitol e inositol e dissacarídeos como maltose e sacarose. De acordo com os resultados, foram observadas diferenças entre os metabolitos dos clones analisados no momento da coleta. Além disso, inferiu-se que os clones podem estar estressados no sistema semi-hidropônico, sendo que as podas podem ser uma das causas de estresse. Além disso, nas atuais condições dos clones, a introdução de gemas *in vitro* principalmente do clone F1, resultaria em maior taxa de oxidação decorrente do maior teor de ácidos caféico e clorogênico presentes nestes tipos de explantes, além disso, uma série de outros fatores podem influenciar a resposta dos clones *in vitro*.

Palavras-Chave: cultura de tecidos, metabólitos primários, metabólitos secundários.

4 CHAPTER 2

POLAR METABOLITES OF YERBA MATE BUDS (*Ilex paraguariensis* A. St - Hil)

ABSTRACT

Yerba mate is a plant of great economic importance for southern Brazil, in addition to the traditional use for preparation of the mate. This species produces many bioactive compounds including methylxanthines, saponins and phenolic compounds. The objective of this study was the identification and quantification of polar compounds present in buds collected on ministumps maintained in a greenhouse in a semi-hydroponic system. Four commercial clones of yerba mate, F1, F2, A03 and A07

were used. A hypothesis was formulated to explain how these metabolites could influence the *in vitro* establishment of these buds. Buds newly collected were used and, after extraction and derivatization of the compounds, the samples were analysed using a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer. Phenolic compounds as quercetin, chlorogenic acid, caffeic acid and quinic acid were identified as well as primary metabolites: monosaccharides such as glucose, fructose, xylose, and ribose; disaccharides such as maltose and sucrose and sugar alcohols such as mannitol and inositol. Differences were observed between the metabolites of the clones analysed at the time of collection; moreover, it appears that the clones may be stressed in the semi-hydroponic system, and pruning may be one of the causes of stress. In the current conditions of the clones, the introduction *in vitro* of buds, mainly of F1 clone, resulted in a higher oxidation rate due to a higher content of chlorogenic and caffeic acid present in these types of explants; however, a number of other factors may influence the response of clones *in vitro*.

Keywords: tissue culture, primary metabolites, secondary metabolites, metabolome.

4.1 INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) também conhecida por mate ou yerba mate é uma árvore de grande importância econômica para a região subtropical da América do Sul (MURAKAMI et al., 2011). É nativa do Brasil, Argentina, Paraguai e pontos menos expressivos no Uruguai (OLIVEIRA e ROTTA, 1983).

Entre os metabólitos primários encontram-se os açúcares e seus derivados, ácidos carboxílicos, lipídeos e aminoácidos. Esses compostos apresentam-se em concentrações variáveis nas células, são polares e são encontrados em qualquer célula viva (VILLAS-BÔAS e GOMBERT, 2006).

Vários compostos potencialmente ativos são encontrados em folhas e produtos finais de erva-mate como as metilxantinas e os compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos) (SCHUBERT et al., 2006; HECK e MEJIA, 2007; ISOLABELLA et al., 2010; MURAKAMI et al., 2011). Os ácidos fenólicos são divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C₆-C₁) como ácido salicílico e ácido gálico. O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C₆-C₃) como ácido caféico e ácido ferúlico. E o terceiro constituem-se das cumarinas que são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico (SOARES, 2002). *In vitro*, o escurecimento dos explantes está

relacionado principalmente à liberação e oxidação dos compostos fenólicos (MELO et al., 2001).

A erva-mate é considerada uma espécie de grande variação fenotípica no conteúdo de metilxantinas (SCHUBERT et al., 2006) e outros metabólitos secundários. Tais características fazem com que seja necessário desenvolver protocolos de regeneração específicos para cada material vegetal, buscando otimizar a resposta *in vitro* (PINHO et al., 2010) uma vez que a oxidação fenólica e a capacidade regenerativa dos explantes é altamente dependente do genótipo utilizado (COSTA et al., 2001; BASSAN et al., 2006; PINHO et al., 2010).

A metaboloma de plantas compreende a identificação e quantificação do conjunto de metabólitos sintetizados por um sistema biológico (FIEHN, 2001; KUSANO et al., 2007). A metabolômica é ainda um campo novo, mas de muita valia, já que é capaz de diferenciar genótipos e fenótipos baseados nos níveis de metabólitos presentes nos tecidos analisados (FRAIGE, 2012). Os metabólitos são intermediários de reações químicas e desempenham um papel importante na conexão das diversas rotas que operam um sistema vivo (VILLAS-BÔAS et al., 2005).

Uma das técnicas para o estudo dos metabólitos nos vegetais é a utilização do CG-MS (cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa), sendo uma técnica rápida e útil para análise de metabólitos termicamente estáveis, incluindo compostos polares e não polares. (DUNN, et al 2005)

O objetivo deste trabalho foi identificar e quantificar os metabólitos presente em gemas coletadas de minicepas mantidas em sistema semi-hidropônico de quatro clones comerciais de erva-mate denominados F1, F2, A03 e A07 no momento da coleta, assim como fazer inferências sobre como estes metabólitos poderiam vir a influenciar o estabelecimento *in vitro* destas gemas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local de pesquisa e coleta do material vegetal

Os experimentos foram realizados na EMBRAPA Florestas localizada no município de Colombo/Paraná-Brasil. Os clones comerciais denominados F1, F2, A03 e A07, são provenientes de um programa de melhoramento genético

desenvolvido pela EMBRAPA Florestas, sendo estes selecionados por várias características silviculturais, tendo como ponto chave de seleção a maior produção de massa verde (RESENDE et al., 2000). O material vegetal dos clones A03 e A07 é procedente de árvores matrizes com 10 anos de idade localizadas no município de Ponta Grossa-PR; por sua vez, os clones F1 e F2 são procedentes de árvores matrizes com 80 anos de idade localizadas no município de São Mateus do Sul-PR.

As plantas utilizadas são mantidas em um minijardim clonal em sistema semi-hidropônico em canaletão com areia, alocado em casa de vegetação. A irrigação por gotejamento foi feita com solução nutritiva (WENDLING e DUTRA, 2008) duas vezes por dia na estação de inverno ($2,5 \text{ L.m}^{-2}$ / aplicação) por um período de 4 min e 40 segundos; e três vezes por dia na estação de verão ($1,7 \text{ L.m}^{-2}$ / aplicação) por um período de 3 min e 6 segundos. A coleta das gemas para a análise dos metabólitos foi realizada um mês após a poda, no período da manhã sendo rapidamente acondicionadas em nitrogênio líquido. Após foram mantidas em freezer a -80°C até posterior extração dos metabólitos.

4.2.2 Análise de metabólitos polares

4.2.2.1 Amostragem, extração e derivatização

Cerca de 100 mg do material vegetal (gemas) foi transferido para um tubo de Eppendorf (2 mL) e extraído durante 15 min a 70°C utilizando 1,5 mL de metanol. O tubo Eppendorf foi centrifugado durante 3 min a 12.000 rpm e o sobrenadante transferido para um tubo de ensaio de 5 mL com tampa de rosca, no qual foi adicionado 1,5 mL de água, 750 μL de clorofórmio e 18 μL de ribitol ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). A solução foi agitada em vortex e os tubos foram centrifugados durante 15 min a 3000 rpm para a separação das fases. A fase metanol/água (superior) foi separada e transferida para tubo Eppendorf e seco a vácuo por 8 horas (Concentrador plus - Eppendorf). Ao extrato seco foi adicionado 50 μL de uma solução de 20 mg.mL^{-1} de metoxiamina-HCl dissolvida em piridina para a reação de oximação (40°C por 90 min), em seguida a amostra foi sililizada e adicionados mais 50 μL de MSTFA a solução (40°C por 90 min). O extrato derivatizado contendo 100 μL de solução foi encaminhado diretamente para análise por CG-MS.

4.2.2.2 Análise por CG – MS

As amostras foram analisadas utilizando um cromatógrafo gasoso (Foucus, Thermo) acoplado a um espectrômetro de massa (Polaris Q Ion Trap, Thermo), equipado com uma coluna capilar revestida (5%-fenil)-metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de espessura de filme) (Coluna Thermo Scientific TG 5-MS). As amostras foram injetadas automaticamente (1 µL, Triplus, Thermo) utilizando o modo de divisão de fluxo 1:25. A separação dos compostos foi feita com a seguinte programação de temperatura do forno: 70°C, isoterma de 4 min, aquecimento até 290°C na taxa de 3°C.min⁻¹, com isoterma final de 15 min. O gás hélio foi usado como gás de arraste com o fluxo de 1,5 ml.min⁻¹. As temperaturas do injetor, interface e fonte de íons são de 290°C, 300°C e 200°C respectivamente. O espectrômetro de massas foi programado para trabalhar com a variação de massa/carga (*m/z*) entre 50–650, tempo total de ciclo de 0,58 s, emissão de corrente a 250 µL e o potencial de ionização por elétron a 70 eV.

4.2.2.3 Tratamento dos dados e base de dados

A determinação dos compostos foi feita pelos espectros de massas (selecionando pelo menos três fragmentos majoritários para a confirmação da estrutura).

A identificação dos metabólitos foi realizada no software AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution, NIST), o qual permite a criação de uma base de dados com espectros de massa, nome e grupo a que pertence o composto, permitindo facilidade nas suas identificações, assim como o site Golm Metabolome Database (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>). Apenas os metabólitos com sinal:ruído (S:R) acima de 150 e detectados em todas as réplicas foram incluídos nas análises estatísticas.

As áreas de pico dos metabólitos foram normalizadas (área total dos picos identificados 100%). Para a identificação dos metabólitos, foi utilizado o programa AMIDS_32. Para a determinação da percentagem relativa de cada composto na amostra, adotou-se a soma de todas as áreas produzidas pelo fragmento majoritário de cada composto, identificados ou não identificados, como sendo 100%, assim a

percentagem individual de cada composto foi relacionada com o todo. Este procedimento foi realizado para cada clone e com 5 repetições biológicas. .

Como fator de exclusão de alguma amostra foi adotado o seguinte critério: analisando a quintuplicata de cada clone o composto foi excluído da análise quando estava presente em 2 ou menos repetições; caso aparecesse em 3 ou 4, a média foi determinada para a amostra faltante.

Todos os dados foram transformados para $-\log_{10}$ para os cálculos estatísticos. A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para reduzir a dimensão dos dados e biplots das amostras e variáveis foram gerados (Uncrambler X10.2®). Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e comparação entre os tratamentos (clones) foram feitos pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Assistat 7.7 beta.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram detectados em gemas de erva mate 43 compostos, deste total foram identificados 22 (Tabela 1). Os compostos foram selecionados para análise estatística com base na PCA (Figura 1).

TABELA 1 – LISTA DE COMPOSTOS IDENTIFICADOS EM GEMAS DE ERVA-MATE, REFERENTE A FIGURA 1B.

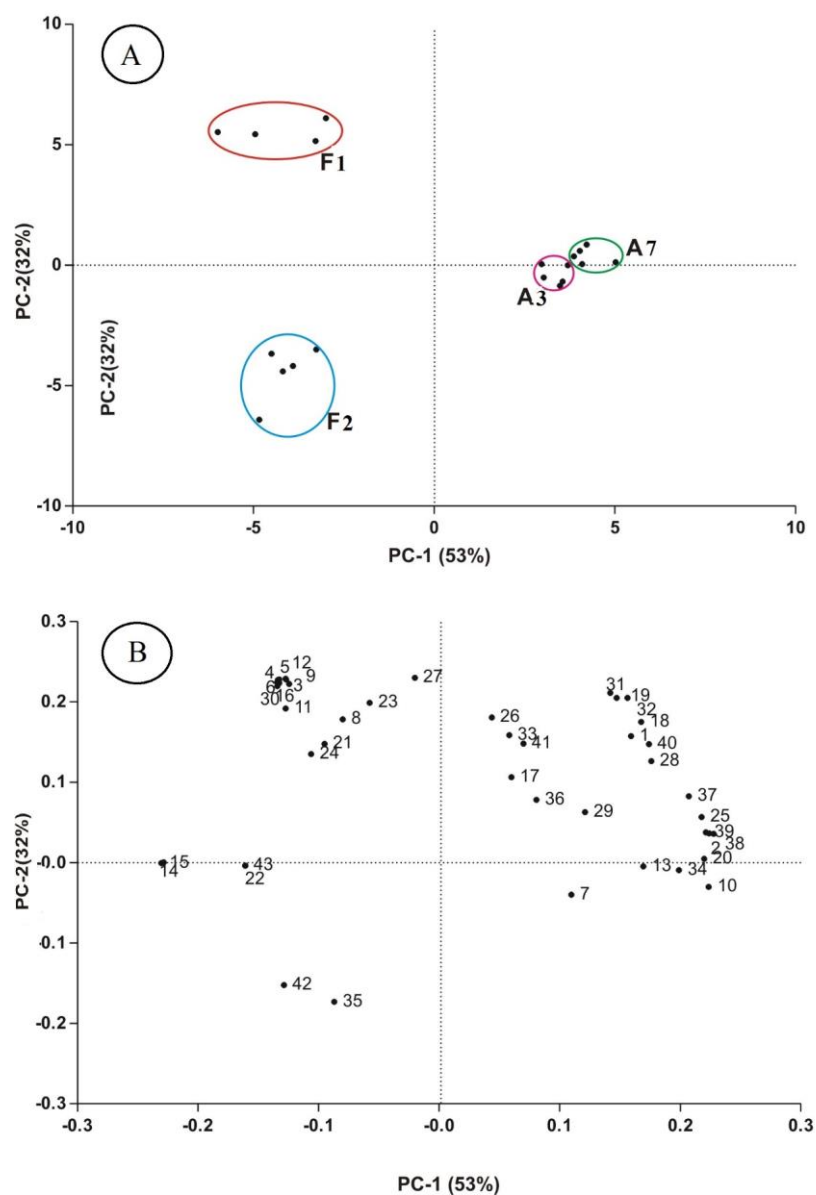
Abreviaturas	Fragmentos (m/z)	Composto	Abundância relativa média (%)			
			F1	F2	A03	A07
1	174, 149, 100	etanolanina	0.497	0.099	0.136	0.094
4	174, 149, 248	glicina	0.046	0	0	0
5	204, 188, 100	serina	0.017	0	0	0
8	246, 230, 128	ácido butanóico	0.554	0	0.046	0
12	246, 230, 128	ácido glutâmico	0.056	0	0	0
14	217, 149, 103	arabinose	0.060	0	0	0
15	217, 149, 307	xilose	0,090	0	0	0
17	217, 149, 147	Ribitol*	-	-	-	-
18	217, 147, 319	ribose	3.82	2.62	1.49	6.34
20	345, 255, 129	ácido isoquínico	0	0.063	0	0
21	345, 255, 256	ácido quínico	7,703	10,988	5,697	11,333
23	217, 147, 319	glicose	3,172	3,795	3,795	6,388
25	149, 147, 319	manitol	0,263	0,104	0,088	0,022
28	305, 217, 149	inositol	3.099	2.129	2.128	2.372
30	219, 396, 381	ácido cafeico	0,186	0	0,014	0
32	331, 217, 169	ácido salicílico	0,022	0,015	0,014	0,011
33	319, 149, 147	ácido málico	0.019	0.009	0.008	0.008
35	205, 361, 362	sacarose	62.87	68.24	68.65	54.09
37	361, 362, 204	maltose	0,258	0,099	0,103	0,021
39	433, 204, 443	ácido clorogênico	0,336	0,128	0,107	0,038

40	204, 191, 433	quercetina	1.555	1.075	1.429	0.699
41	217, 319, 149	frutose	1.263	1.026	0.960	1.997
Compostos não identificados (abreviaturas)						
2, 3, 6, 7, 9, 10, 11,13,16, 19, 22, 24, 26, 27, 29, 31,34, 36, 38, 42,43						

*Padrão interno, não é considerado nos cálculos da abundância relativa total; m/z: massa/carga.

A PCA é útil para identificar o fator-chave do metaboloma (TOHGE et al., 2005), uma vez que separa os compostos que mais contribuem para um determinado conjunto de amostras. Essa separação é determinada pela abundância relativa de cada composto, com base na área produzida pelo fragmento de quantificação relativa. O método indica e classifica as principais fontes de variações dentro de um conjunto de dados, e permite o agrupamento devido às características das amostras. Os dois primeiros componentes principais explicam 85% do sistema, sendo que os metabólitos presentes nas gemas apontam diferença entre os clones quando utilizado PC1 versus PC2 (Figura 1A), assim as amostras dos clones na Figura 1A são explicadas pelas variáveis (loadings) dos compostos visualizados na Figura 1B.

FIGURA 1 – BIPLLOT GERADOS PELA ANÁLISE DE PCA



LEGENDA: (A) AMOSTRAS (SCORES) E (B) VARIÁVEIS (LOADINGS) DETECTADAS (m/z) DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS CLONES

Os compostos relacionados ao metabolismo primário selecionados com base na figura 1B foram os monossacarídeos glicose (23), frutose (41) e ribose (18); açúcares álcoois manitol (25) e inositol (25); e dissacarídeos maltose (37) e sacarose (35). Dos metabólitos secundários, foram selecionados os ácidos fenólicos: ácido caféico (30), ácido clorogênico (39), ácido quínico (21) e ácido salicílico (32) e do grupo dos flavonóides a quercetina (40).

Não foi verificada diferença estatística entre os clones para a frutose, a ribose, o inositol e a sacarose. Para os demais compostos houve diferença estatística

(Tabela 2). Analisando a glicose nota-se que o clone A07 diferiu dos demais, apresentando maior concentração nos tecidos; para maltose, a diferença estatística ocorreu no clone F1. Para manitol, o clone F1 apresentou maior concentração do composto, no entanto diferiu apenas do clone A07 (Tabela 3).

TABELA 2 - SIGNIFICÂNCIA DO TESTE F PARA OS COMPOSTOS MONOSSACARÍDEO GLICOSE, AÇÚCAR ÁLCOOL MANITOL E DISSACARÍDEO MALTOSE.

	Monossacarídeo	Açúcar Álcool	Dissacarídeo
Significância do teste F	Glicose	Manitol	Maltose
	5,6411**	5,3947**	6,7188**

ns nível descritivo de probabilidade não significativo a 5%; * significativo a 5% de probabilidade; ** significativo a 1% de probabilidade.

TABELA 3 – ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS COMPOSTOS MONOSSACARÍDEO GLICOSE, AÇÚCAR ÁLCOOL MANITOL E DISSACARÍDEO MALTOSE ENTRE OS CLONES F1, F2, A03 E A07

Clones	Monossacarídeos	Açúcar Álcool	Dissacarídeo
	Glicose	Manitol	Maltose
F1	3,172 ^b	0,263 ^a	0,258 ^a
F2	3,795 ^b	0,104 ^{ab}	0,099 ^b
A03	3,795 ^b	0,088 ^{ab}	0,103 ^b
A07	6,388 ^a	0,022 ^b	0,0219 ^b

Dados seguidos de letras distintas em uma mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

As folhas maduras produzem mais carboidratos do que necessitam para manter seu metabolismo e crescimento, exportando os fotoassimilados excedentes para tecidos fotossinteticamente menos ativos ou inativos (DANTAS et al., 2007). As gemas analisadas neste estudo são drenos, ou seja, recebem os fotoassimilados das folhas maduras (fontes) para seu crescimento vegetativo (TAIZ e ZEIGER, 2009). Os açúcares álcoois translocados da fonte para o dreno, incluem manitol, sorbitol e inositol.

Não foi identificado sorbitol nas gemas analisadas. Como não houve diferença estatística entre os clones para inositol, supõe-se que as gemas dos clones estão recebendo proporção semelhante deste açúcar. Já para o manitol foi verificada diferença estatística entre os clones F1 e A07 (Tabela 3). O manitol é relatado como um açúcar álcool ligado diretamente com a manutenção do potencial osmótico, contribuindo para tolerância ao estresse salino, por exemplo, (WILLADINO e CAMARA, 2010) sugerindo que o clone F1 é, portanto, mais resistente a estresses.

O açúcar não redutor mais translocado da fonte para o dreno é a sacarose (TAIZ e ZEIGER, 2009). A sacarose presente nos tecidos pode ser quebrada

liberando glicose e frutose. O teor de glicose no clone A07 foi estatisticamente superior aos demais, inferindo que o mesmo pode estar utilizando mais esse substrato para crescimento e maturação de órgãos; já para os demais clones não houve diferença estatística indicando que a glicose pode estar sendo utilizada em outra rota metabólica, como substrato para síntese de compostos fenólicos, por exemplo.

Todos os ácidos fenólicos selecionados apresentaram diferença estatística entre os clones (Tabela 4), porém para o flavonoide quercetina não foi detectada diferença.

Os compostos fenólicos, também chamados de polifenóis, são divididos em dois grupos, flavonóides e ácidos fenólicos, e são sintetizados, em muitos casos, em resposta a uma condição de estresse (ADOLPHO, 2012). Os ácidos fenólicos caracterizam-se por apresentarem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo a estes compostos propriedades antioxidantes (SOARES, 2002).

Com relação ao ácido quínico, o clone F1 não diferiu de F2 e A07. Para os clones F2 e A07 não foi detectada a presença de ácido caféico nos tecidos. Não foi observada diferença estatística entre os clones F2, A03 e A07 para o composto ácido clorogênico (Tabela 5). O ácido clorogênico identificado neste trabalho é do grupo cafeilquínico, sendo formado pela união de uma molécula de ácido caféico com uma molécula de ácido quínico (MARIA e MOREIRA, 2004; CARDOZO JÚNIOR et al., 2007).

TABELA 4 - SIGNIFICÂNCIA DO TESTE F PARA OS COMPOSTOS ÁCIDO CAFÉICO, ÁCIDO CLOROGÊNICO, ÁCIDO QUÍNICO E ÁCIDO SALICÍLICO.

Ácidos Fenólicos	Significância do teste F
Ácido Caféico	803,5996**
Ácido Clorogênico	13,3316**
Ácido Quínico	5,0999*
Ácido Salicílico	21,2339**

^{ns} nível descritivo de probabilidade não significativo a 5%; * significativo a 5% de probabilidade; ** significativo a 1% de probabilidade.

TABELA 5 - ABUNDÂNCIA RELATIVA PARA OS COMPOSTOS ÁCIDO CAFÉICO, ÁCIDO CLOROGÊNICO, ÁCIDO QUÍNICO E ÁCIDO SALICÍLICO ENTRE OS CLONES F1, F2, A03 E A07.

Clones	Ácidos Fenólicos (%)			
	Ácido Caféico	Ácido Clorogênico (cafeoilquínico)	Ácido Quínico	Ácido Salicílico
F1	0,186 ^a	0,336 ^a	7,703 ^{ab}	0,022 ^a
F2	0 ^c	0,128 ^b	10,988 ^a	0,015 ^b
A03	0,014 ^b	0,107 ^b	5,697 ^b	0,014 ^{bc}
A07	0 ^c	0,038 ^b	11,333 ^a	0,011 ^c

Dados seguidos de letras distintas em uma mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

As gemas do clone F1 apresentaram uma concentração maior de ácido caféico, ácido clorogênico e ácido salicílico, sendo estatisticamente superior aos demais. O ácido caféico, e os ácidos clorogênicos são alguns dos ácidos fenólicos mais relatados em erva mate (ISOLABELLA et al., 2010; MURAKAMI et al., 2011; BAE et al., 2015). Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na biossíntese dos compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido mevalônico, sendo esta última menos significativa em plantas superiores. Assim, a rota do ácido chiquímico converte precursores de carboidratos derivados da glicólise e da rota da pentose-fosfato em aminoácidos aromáticos como a fenilalanina, sendo este o principal aminoácido do qual deriva os compostos fenólicos (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Em condições normais, esses ácidos fenólicos protegem os tecidos das plantas, porém, *in vitro*, uma das principais causas da oxidação dos tecidos é decorrente principalmente da oxidação enzimática desses compostos (ZHOU et al.; 2010). O resultado desse processo é a produção de substâncias tóxicas (quinonas) ocasionando, não raramente, a morte dos explantes (COSTA et al., 2006; KARIYANA e KARIYANA, 2013). Uma série de outros fatores *in vitro* vão influenciar também a resposta dos tecidos, como desinfestação, meio de cultura, reguladores vegetais, temperatura, entre outros.

Como o clone F1 foi o genótipo estatisticamente superior com relação a estes compostos, teoricamente, seria o clone de maior dificuldade de estabelecimento *in vitro*. Cabe salientar que os clones A07 e F2 não apresentaram ácido caféico na análise dos metabólitos, mas apresentaram ácido clorogênico, significando que a rota de biossíntese está ativa.

O clone F1 também apresentou diferença significativa dos clones F2, A03 e A07 para o composto ácido salicílico. O ácido salicílico é um ácido fenólico descrito na literatura como um composto sinalizador (PIETERSE et al., 2005; BORSATTI et

al., 2015) que regula os processos fisiológicos, assim como está relacionado a resistência a doenças e indução de tolerância aos diferentes tipos de estresse abióticos (FERNANDES et al., 2009; VIEIRA, 2011). Com a presença desse composto nas gemas dos clones no tempo zero (coleta) especula-se que as minicepas de erva-mate mantidas em sistema semi-hidropônico estão estressadas, principalmente decorrente da grande quantidade de coletas (podas) realizadas nesses indivíduos. Segundo SCHUBERT et al. (2006), um dos fatores que afetam o teor de metabólitos secundários nos tecidos é o tipo de poda e intervalo entre podas.

Nota-se que o clone F1 apresenta maior quantidade de ácido salicílico e também caféico e clorogênico, ou seja, frente ao estresse, há a sinalização pelo ácido salicílico, resultando na maior produção de antioxidantes para proteção dos tecidos, como uma resposta de defesa. Esse mecanismo de percepção do estresse, sinalização e resposta e defesa é descrita na literatura (SILVA, 2008).

4.4 CONCLUSÕES

Decorrente da análise dos metabólitos presentes nas gemas dos clones A03, A07, F1 e F2, no momento da coleta, confirma-se que há diferenças entre os clones analisados, tanto em termos de metabólitos primários quanto secundários.

O estudo químico dos clones no momento da coleta pode auxiliar na escolha do genótipo para introdução *in vitro*, sendo que, pelo maior teor de ácido clorogênico e ácido caféico nas gemas do clone F1, infere-se que, *in vitro* as gemas deste genótipo (nas condições atuais) apresentariam maior taxa de oxidação, e consequentemente seria o clone de maior dificuldade de estabelecimento. Porém, uma série de outros fatores podem influenciar a resposta dos clones *in vitro* (meio de cultura, reguladores vegetais, assepsia, temperatura entre outros).

4.5 REFERÊNCIAS

ADOLPHO, L. O. **Derivados dos ácidos clorogênico, caféico e cinâmico: obtenção, avaliação da atividade antimicrobiana e de inibição enzimática**. 145 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa maria, 2012.

BAE, K.; HAM, H. M.; JEONG, M. H.; KIM, D. H.; KIM, H. J. Simultaneous determination of 15 phenolic compounds and caffeine in teas and mate using RP-

HPLC/UV detection: Method development and optimization of extraction process. **Food Chemistry**, v. 172, p. 469-475, 2015.

BASSAN, J. S.; REININGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.). **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.

BORSATTI, F. C.; MAZARO, S. M.; DANNER, M. A.; NAVA, G. A.; DALACOSTA, N. L. Indução de resistência e qualidade pós-colheita de amora-preta tratada com ácido salicílico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 2, p. 318-326, 2015.

CARDOZO JÚNIOR, E. A.; FERRARESE-FILHO, O.; FILHO, L. C.; FERRARESE, M. L. L. F.; DONADUZZI, C. M.; STURION, J. A. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* A. ST Hil) progenies grown in Brazil. **Journal of food composition and analysis**, v. 20, p. 553-558, 2007.

CARDOZO JÚNIOR, E. A.; FERRARESE-FILHO, O.; FILHO, L. C.; FERRARESE, M. L. L. F.; DONADUZZI, C. M.; STURION, J. A. Quantitative genetic analysis of methylxanthines and phenolic compounds in mate progenies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 171-177, 2010.

COSTA, C. M. C.; MAIA, L. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; NOGUEIRA, R. J. M. C. Influência de fungos micorrízicos asbusculares sobre o crescimento de dois genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 6, p. 893-901, 2001.

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. Efeito da interação entre carvão ativado e N⁶- Benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, CV. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.

DANTAS, N. F.; RIBEIRO, L. DE. S.; PEREIRA, M. S. Teor de açúcares solúveis e insolúveis em folhas de videira, cv. Syrah, em diferentes posições do ano e época do ano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 1, p. 042-074, 2007.

DUNN, W. B.; BAILEY, N. J. C.; JOHNSON, H. E. Measuring the metabolome: current analytical technologies. **Analyst**, v.130, p. 606–625, 2005.

FERNANDES, C. F.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; SILVA, D. S. G.; REIS, N. D.; ANTUNES JÚNIOR, H. **Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2009. 18 p. (Embrapa Rondônia. Documento, 133).

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comparative and Functional Genomics**, v. 2, p. 155-168, 2001.

FRAIGE, K. **Estudo comparativo do perfil metabolômico e proteômico de uvas (*Vitis vinifera*) durante o processo de maturação utilizando ferramentas**

bioanalíticas. 227 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 138-151, 2007.

ISOLABELLA, S.; COGOI, L.; LÓPEZ, P.; ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R.; Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122, p. 695-699, 2010.

KARIYANA, N.; KARIAYANA, K. Effect of ascorbic acid, activated charcoal and light duration on shoot regeneration of banana cultivar Barangan (*Musa acuminata* L.) *in vitro* culture. **IJRRAS**, v. 15, n. 1, p. 13-17, 2013.

KUSANO, M.; FUKUSHIMA, A.; ARITA, M.; JONSSON, P.; MORITZ, T.; KOBAYASHI, M.; HAYASHI, N.; TOGHE, T.; SAITO, K. Unbiased characterization of genotype-dependent metabolic regulations by metabolomic approach in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Systems Biology**, v. 53, p. 53, 2007.

MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.]. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 6, p.1301-1306, 2001.

MURAKAMI, A. N. N.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMANTE, E. R.; ZANOTTA, L. M.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J. C. C.; TEÓFILO, R. F. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 2211-2216, 2011.

OKAZAKI, K.; KIMURA, Y.; SUGIYAMA, K.; KAMI, D.; NAKAMURA, T.; OKA, N. Discovering metabolic indices for early detection of squash (*Cucurbita maxima*) storage quality using GC–MS-based metabolite profiling. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1150–1155, 2016.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. Área de distribuição natural de erva-mate. In: Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais: silvicultura da erva-mate, 10, 1983, Curitiba, **Anais...**Curitiba: URRPFCS, 1983. p. 17-35. (EMBRAPA- URRPFCS. Documentos, 25

PIETERSE, C. M. J.; VAN PELT, J. A.; VAN WEES, S. C. M.; TON, J.; VERHAGEN, B. W. M.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K.; HASE, S.; DE VOS, M.; OOSTEN, V. V.; POZO, M.; SPOEL, S.; VAN DER ENT, S.; KOORNNEEF, A.; CHALFUN-JUNIOR, A.; RESENDE, M. L.V.; VAN LOON, L. C. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 13, n. 1, p. 277-295, 2005.

PINHO, D. S.; REY, M. S.; VEEIRA, A.; DANIELOWSKI, R.; BRAGA, E. J. B.; PETERS, J. A. Regeneração in vitro de melão, cv. 'Gaúcho'. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1083-1089, 2010.

RESENDE, D. V. M.; STURION, A. J.; CARVALHO, P. A.; SIMEÃO, M. R.; FERNANDES, S. C. J. **Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela Embrapa: resultados da avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000, 60 p. (Embrapa Florestas. Circular Técnica, 43).

SCHUBERT, A.; ZANIN, F. F.; PEREIRA, D. F.; ATHAYDE, M. L. Variação anual de metilxantinas em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1233-1236, 2006.

SILVA, R. A.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. P. **Defesa de plantas contra ataques de patógenos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008, 56 p. (Embrapa Agrobiologia. Documento 250)

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes – Revisão. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 722 p.
TOHGE, T.; NISHIYAMA, Y.; HIRAI, M. Y.; YANO, M.; NAKAJIMA, J.; AWAZUHARA, M.; INOUE, E.; TAKAHASHI, H.; GOODENOWE, D. B.; KITAYAMA, M.; NOJI, M.; YAMAZAKI, M.; SAITO, K. Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. **The Plant Journal**, v. 42, p. 218-2235, 2005.

VIEIRA, J. G. **Aplicação exógena de ácido salicílico em feijoeiro**. 48 f. Dissertação (Mestre em Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2011.

VILLAS-BÔAS, S. G.; MAS, S.; AKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, p. 613-646, 2005.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Ano IX, n. 36, p. 58-59, 2006.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F. Solução Nutritiva para condução de minicepas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) em sistema semi-hidropônico. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. 4p. (Embrapa Florestas. Circular Técnica 157).

WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Tolerância das plantas à salinidade: aspectos biológicos e bioquímicos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 11, 2010.

ZHOU, BIN.; WEN, X.; WANG, R.; JIA, J. Quantification of the enzymatic browning and secondary metabolites in the callus culture system of *Nigella glandulifera* Freyn et Sint. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v. 5, n. 3, p. 109-116. 2010.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Capítulo 1

Estudos mais aprofundados, visando elucidar a relação planta/bactéria são necessários, assim como a realização de testes bioquímicos para descobrir o potencial da *Agrobacterium larrymoorei* para produção de auxina, biofilme entre outros.

Para aquisição de meristemas livres de bactérias, a redução do número de primórdios foliares dos explantes introduzidos *in vitro*, pode ser o caminho para a obtenção de culturas axênicas, porém, estudos de varredura interna aos tecidos, ou isolamento dos tecidos em meio para crescimento bacteriano, após o estabelecimento dos meristemas, devem ser realizados, uma vez que nem sempre ocorre o crescimento bacteriano no meio de cultura, e uma falsa cultura “axênica” pode ser tomada como verdade.

Mais estudos são necessários visando elucidação do efeito do carvão ativado adicionado ao meio de cultura sobre os compostos do meio e reguladores de crescimento, e o efeito desta interação com os tecidos vegetais, assim como experimentos com concentrações mais altas e baixas de 2iP do que 8,8µM são necessários, visando obter brotações múltiplas dos explantes *in vitro*.

Capítulo 2

Levanta-se a hipótese de que os clones estão estressados no sistema semi-hidropônico, fato este explicado pela presença de ácido salicílico, sendo o grande número de podas um dos fatores que podem estar causando o estresse. Porém, para confirmação desta hipótese, estudos comparativos com plantas mantidas no mesmo sistema sem a realização das podas deverão ser realizados.

Estudos de introdução das gemas *in vitro* dos clones, para posterior determinação e quantificação dos metabólitos fazem-se necessários, visando entender o comportamento dos metabólitos no ambiente *in vitro*, e também para comparação dos metabólitos presentes no momento da coleta e confirmação da hipótese levantada de que gemas do clone F1 seriam menos responsivas *in vitro*.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA (mg.L⁻¹)

Composto	MS	½ MS	¼ MS	WPM
NH ₄ NO ₃	1650	825	412,5	400
KNO ₃	1900	950	475	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	-	556
K ₂ SO ₄	-	-	-	990
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	220	110	96
KI	0,83	0,415	0,2075	-
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,0125	0,00625	-
KH ₂ PO ₄	170	85	42,5	170
H ₃ BO ₃	6,2	3,1	1,55	6,2
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,125	0,0625	0,25
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	11,15	5,575	22,3
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185	92,5	370
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,0125	0,00625	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	4,3	2,15	8,6
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	18,65	9,325	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	13,9	6,95	27,8
Vitaminas e compostos orgânicos				
Pyridoxine	0.5	0.5	0.5	0.5
Nicotinic Acid	0.5	0.5	0.5	0.5
Thiamine	0.1	0.1	0.1	1.0
Glycine	2.0	2.0	2.0	2.0
Myo-inositol	100	100	100	100

ANEXO 2 – COMPOSIÇÃO IÔNICA DOS MEIOS DE CULTURA

Macronutrientes (mM)	MS	1/2MS	1/4MS	WPM
NH ₄	20,61	10,30	5,15	4,99
NO ₃	39,40	19,70	9,85	9,69
K	20,04	10,02	5,01	12,61
Ca	2,99	1,49	0,74	3,00
Mg	1,50	0,75	0,37	1,50
So ₄	1,76	0,88	0,44	7,44
Po ₄	1,25	0,62	0,31	1,25
Micronutrientes (µM)				
Mn	0,13	0,065	0,032	0,13
Zn	0,03	0,015	0,007	0,03
Na	0,22	0,110	0,055	0,22
Fe	0,11	0,055	0,027	0,11
Cl	6,00	3,000	1,500	1,31
Co	0,10	0,050	0,025	---
Cu	0,10	0,050	0,025	0,10
MoO ₄	1,03	0,515	0,257	1,03
B	25,00	12,500	6,250	25,00
I	4,99	2,495	1,247	---
NH ₄ / NO ₃ (mM)	0,52	0,52	0,52	0,51
Total N	60,00	30,00	15,00	14,58
Total de sais (mM)	94,25	47,13	23,56	59,98
Vitaminas e compostos orgânicos (mM)				

Piridoxina	0,0024	0,0024	0,0024	0,0024
Ácido Nicotínico	0,004	0,004	0,004	0,004
Tiamina	0,0003	0,0003	0,0003	0,003
Glicina	0,027	0,027	0,027	0,027
Myo-inositol	0,56	0,56	0,56	0,56

ANEXO 3 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA LB PARA CRESCIMENTO BACTERIANO

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Extrato de Levedura	5
Tryptona	10
NaCl	10
Ágar	16
pH	7,5

ANEXO 4 – DESDOBRAMENTO DA ANÁLISE DO EXPERIMENTO NOMEADO EFEITO DE CITOCININA ASSOCIADA AUXINA ANA.

Comparação entre os tratamentos	Significância do teste para as variáveis	
	Coloração	Estado
30 dias <i>in vitro</i>		
Cinetina* vs BAP*	Qs=1,637 (p=0,201; g.l=1) ^{ns}	Qs=4,031 (p=0,045; g.l=1)
Cinetina* vs 2iP*	Qs=10,5118 (p=0,001; g.l=1)	Qs=9,727 (p=0,002; g.l=1)
Cinetina* vs testemunha	Qs=2,267 (p=0,132; g.l=1) ^{ns}	Qs=1,42 (p=0,233; g.l=1) ^{ns}
BAP* vs 2iP*	Qs=0,001 (p=0,974; g.l=1) ^{ns}	Qs=1,618 (p=0,203; g.l=1) ^{ns}
BAP* vs testemunha	Qs=0,001 (p=0,974; g.l=1) ^{ns}	Qs=1,155 (p=0,283; g.l=1) ^{ns}
2iP* vs testemunha	Qs=5,250 (p=0,022; g.l=1)	Qs=5,638 (p=0,018; g.l=1)
60 dias <i>in vitro</i>		
Cinetina* vs BAP*	Qs=0,024 (p=0,877; g.l=1) ^{ns}	Qs=1,970 (p=0,160; g.l=1) ^{ns}
Cinetina* vs 2iP*	Qs=14,787 (p<0,001; g.l=1)	Qs=14,686 (p<0,001; g.l=1)
Cinetina* vs testemunha	Qs=0,568 (p=0,451; g.l=1) ^{ns}	Qs=0,772 (p=0,379; g.l=1) ^{ns}
BAP* vs 2iP*	Qs=13,54 (p<0,001; g.l=1)	Qs=5,354 (p=0,021; g.l=1)
BAP* vs testemunha	Qs=0,701 (p=0,402; g.l=1) ^{ns}	Qs=0,303 (p=0,582; g.l=1) ^{ns}
2iP* vs tstemunha	Qs=11,907 (p<0,001; g.l=1)	Qs=8,167 (p=0,004; g.l=1)

Sendo: A comparação entre os tratamentos é significativa quando p-valor for menor que 0,05; ns: nível descritivo de probabilidade não significativo a 5%; *concentração de 8,8 µM.

ANEXO 5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DO EXPERIMENTO NOMEADO EFEITO DO AGENTE DESINFESTANTE.

Variável	30 dias <i>in vitro</i>	60 dias <i>in vitro</i>
Coloração*	Qs=3,915 (p=0,271, gl = 3) ^{ns}	Qs=1,965 (p=0,579, gl = 3) ^{ns}
Estado**	Qs=6,504 (p=0,089, gl = 3) ^{ns}	Qs=5,091 (p=0,165, gl = 3) ^{ns}

Sendo: A análise é significativa quando p-valor for menor que 0,05; ns: nível descritivo de probabilidade não significativo a 5%; *Variável referente a coloração dos meristemas (verdes, amarelos ou marrons (oxidados)); **Variável referente ao estado dos meristemas (intumescidos ou estagnados)